

THESIS

BOHN

1969

DER EINFLUSS CYTOSTATISCHER SUBSTANZEN (CYCLOPHOS-
PHAMID UND 2,3,5-TRIS-AETHYLENIMINO-BENZOCHI-
NON-(1,4)) AUF DEN ENERGIESTOFFWECHSEL JUNGER
UND ALTER RINDERLINSEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Kwasi Karikari Adusa-Amankwa
aus Bekawi/Ghana

Bonn 1969

DER EINFLUSS CYTOSTATISCHER SUBSTANZEN (CYCLOPHOS-
PHAMID UND 2,3,5-TRIS-AETHYLENIMINO-BENZOCHI-
NON-(1,4)) AUF DEN ENERGIESTOFFWECHSEL JUNGER
UND ALTER RINDERLINSEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Kwasi Karikari Adusa-Amankwa
aus Bekawi/Ghana

Bonn 1969

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Referent: Professor Dr. O. Hockwin
Korreferent: Professor Dr. E. Weigelin

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1969

Aus dem Klinischen Institut für
experimentelle Ophthalmologie
der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. E. Weigelin

Herstellung: R. Schwarzbald, Witterschlick b. Bonn

Meinem alten Lehrer G.M. TIEKU gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Problemstellung	7
2. Entwicklungsgeschichtliche Übersicht	12
3. Anatomie und Physiologie der Linse	13
4. Der Kohlenhydratstoffwechsel der Linse	19
5. Zytostatica	25
6. Methodik der Versuche	
a) Gewinnung des Tiermaterials	32
b) Wägung	32
c) Inkubation	33
d) Aufarbeitung	33
e) Die photometrische Bestimmung von ATP, ADP, AMP, NAD	34
7. Ergebnisse	40
8. Diskussion	41
9. Zusammenfassung	42
10. Tabellen und Abbildung	43
11. Abkürzungsverzeichnis	56
12. Literaturverzeichnis	57
13. Lebenslauf	

1. Problemstellung

Otto WARBURG entdeckte 1923 die Gärung der Tumoren, diejenige biochemische Eigenschaft, durch die sich das Tumorstadium von einem normalen Wachstum unterscheidet.

Zwar spalten alle normal wachsenden Körperzellen bei Ausschluß von Sauerstoff Glukose zu Milchsäure, aber in normalen Zellen verschwindet bei Zutritt von Sauerstoff diese Gärung; sie macht einem reinen Oxydationsstoffwechsel Platz.

Die bösartigen Geschwülste gehören zu den wenigen Geweben, die auch bei Anwesenheit von Sauerstoff eine hohe Glykolyse aufweisen. Es scheint so, daß die Glykolyse der bevorzugte Weg zum Energiegewinn für diese Zellen ist. Es sind also größere Glukosemengen zur Energieproduktion notwendig, und lokal kann man das vermehrte Auftreten des Endproduktes der Glykolyse, nämlich der Milchsäure, nachweisen. Bekannt sind die Untersuchungen von WARBURG, CORI u.a., daß bei Tumoren das venöse Blut beträchtlich mehr Milchsäure und weniger Glukose als das arterielle enthält. Wie schon erwähnt, führt der Zusatz von Sauerstoff im gesunden Gewebe zu einer Hemmung der Glykolyse, bei Tumoren dagegen bleibt die Gärung mit der Milchsäurebildung auch im sauerstoffhaltigen Milieu - d.h. bei Zufuhr von O_2 - erhalten.

Die Untersuchungen bis in die jüngste Zeit hinein ließen immer wieder erkennen, daß eine normaliter im Tumorgewebe nachzuweisende Glykolyse gleichartig einer Gärung von normalem glykolyisierendem Gewebe ist. Es fanden sich nie abnorme Intermediärprodukte oder sonstige Abweichungen.

Die Glykolyse bildet aber einen unökonomischen Weg zur Energiegewinnung, wenn evtl. normale Stoffwechselwege nicht möglich oder verlegt sind. Bereits WARBURG fand, daß nicht nur Tumoren, sondern auch alle embryonalen jungen, auch rasch wachsenden oder regenerierenden Gewebe eine sehr hohe Glykolyse aufweisen.

Für die Tumorzelle bedeutet die aerobe Glykolyse sicher eine unökonomische Energieproduktion. Die Tatsache ist seit WARBURG immer wieder bestätigt worden.

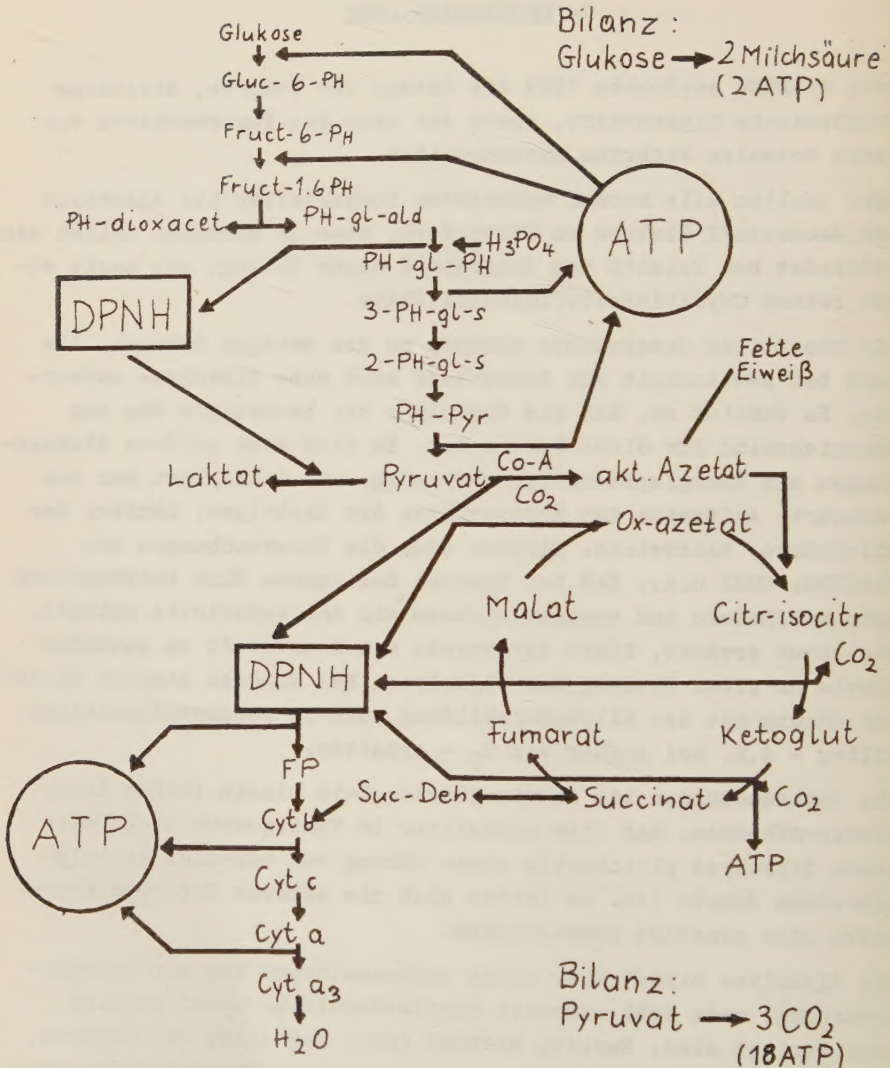


Abb.1: Schema des vollständigen Abbaues der Glukose über die Glykolyse, den Zitronensäurezyklus und die Atmungskette

Abbildung 1 zeigt in schematischer Sicht, daß bei der glykolytischen Phosphorylierung wesentlich weniger ATP (Adenosintriphosphat) gebildet wird als bei der Atmungsketten-Phosphorylierung.

Beim Abbau eines Mols Glukose zu zwei Mol Milchsäure (Laktat) werden zwei Mol ATP gebildet. Dagegen werden beim vollständigen Abbau von zwei Mol Brenztraubensäure (Pyruvat), die aus einem Mol Glukose entstanden sind, 36 Mol ATP gebildet. Die Tumorzelle gewinnt daher, wenn sie die Glukose nur zur Milchsäure abbaut, nur $1/18$ der Energie, die bei vollständigem oxydativen Abbau erhalten werden könnte. Diese Tatsache, umgerechnet in Kalorien, ergibt folgende Bilanz:

Bei der Spaltung von Glykogen zu Milchsäure oder Brenztraubensäure werden pro Glukosemolekül etwa 58 000 cal frei, wovon nur ca. 38 %, also ungefähr 22 000 cal in Form von Phosphatesteren genutzt werden.

Im Gegensatz dazu liefert die Endoxydation zweier Brenztraubensäuremoleküle ca. 300 000 cal. Davon bleiben etwa 150 000 cal in Form der energiereichen Phosphate, wie ATP usw., für die Zellen erhalten (LÜHRS).

Es ist nicht ganz zu verstehen und auch noch ungeklärt, warum Tumorzellen in gleichem Umfang Sauerstoff aufnehmen wie die meisten normalen Zellen. In der gleichen Zeit wird aber eine größere Menge von Glukose umgesetzt als der aufgenommenen Sauerstoffmenge entspricht. In dieser Hinsicht sind Untersuchungen interessant, die ESCHBACH und NEGELEIN am Portioepithel, an den verschiedenen, veränderten Epithelmetaplasien bis zum echten invasiven Portiokarzinom, am Stoffwechsel dieser Gewebe erhoben.

Sie geben einen Einblick in die Energieproduktion von Krebszellen und von normalen Zellen, wie sie z.B. WARBURG et al. angegeben hatten. Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen zeigen charakteristische Unterschiede der Energieproduktion dieser verschiedenen Gewebe.

Daraus geht hervor, daß vom normalen Portioepithel über die verschiedenen Veränderungen bis zum eigentlichen Kollumkarzinom nicht nur die Glykolyse ansteigt, sondern es findet sich eine mäßige Steigerung der Atmung, die allerdings im Verhältnis zur Glykolyse in ihrer Größenordnung untergeordnet erscheint.

Diese Tatsache, daß auf jeden Fall die Atmung innerhalb der energetischen Stoffwechselprozesse in der Tumorzelle mitunter zu niedrig befunden wird, führte zu vielen therapeutischen Versuchen, durch zwei-, dreiwertige, sowie komplexe Eisenverbindungen oder Zytochrom-C, die Leistung des Zytochromsystems und der mit ihr verbundenen Atmung zu steigern. Alle diese Versuche scheiterten. Versuche von W. LÜHRS mit Zytochrom-C, über eine lange Zeit Krebskranken verabreicht, waren ebenfalls negativ.

Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Zytochrom-C ließ sich neuerdings zeigen, daß dieses injizierte Ferment vom Organismus als körperfremd behandelt wird, d.h. nicht in die Zellen aufgenommen, sondern ausgeschieden wird. Es konnte daher nicht zur Funktion gelangen (NADKARNI, GOLDENTHAL und SMITH).

Alle tumorhemmenden Substanzen wirken irgendwie hemmend auf die Zellteilung (zytostatisch). Einesteils liegt die Wirkung darin, daß die DNA (Desoxyribonukleinsäure) durch den schädigenden Einfluß dieser Substanzen nicht mehr in genügender Menge für die sich hier sehr rasch aufeinanderfolgenden Kernteilungen bereitgestellt werden kann, anderenteils ist es ein direkter toxischer Effekt auf die Mitose selbst - und in anderen Fällen (Hormone) ist der Wirkungsmechanismus überhaupt nicht völlig geklärt (MOESCHLIN).

Im ganzen wird für jede Zellteilung (Mitose) Energie gebraucht. Wenn die Zellteilung nun gesteigert ist, wird mehr Energie gebraucht. Damit wird es selbstverständlich, daß diejenigen proliferativen Prozesse im menschlichen Organismus, wie bei Granulozytopoese im Knochenmark oder Samenproduktion im Hoden, ein größeres Angebot an Energieverbrauch verlangen dürften.

Tumorstadium ist auch ein proliferativer Prozeß, und wie bei

anderen proliferativen Prozessen wurde ein größeres Angebot an Energie benötigt. Wenn die benötigte Energie nicht zur Verfügung steht, ist eine rasche Zellteilung nicht möglich. Eine Mitose kann also nur dann erfolgen, wenn die Zelle genügend energiereiches Phosphat angehäuft hat, so wie es bei den Zellen der meisten tierischen Organe durch die oxydative Phosphorylierung nachgewiesen werden kann (LÜERS).

Die Normalzellen scheinen in bezug auf Wachstum als auch Erhaltung stets auf die Atmungsenergie angewiesen zu sein.

Die Wachstumsenergie der Tumorzelle setzt sich ganz offensichtlich aus Gärungs- und Atmungsenergie zusammen, während zur Erhaltung der Tumorzelle schon eine der beiden Energieformen ausreicht (GRAFFI u. BIELKA).

Schon seit langer Zeit ist bekannt, daß der Stoffwechsel der Linse gewisse Ähnlichkeit mit dem Stoffwechsel der Tumoren zeigt. Besonders die Untersuchungen von MÜLLER, NORDMANN, HOCKWIN, DARDENNE und SCHMACK konnten nachweisen, daß die Linse eine überwiegend aerobe Glykolyse besitzt. Auch bezüglich des Wachstums finden sich Parallelitäten zu den Tumoren, die Zunahme an Volumen von Linsen ist dabei besonders zu Beginn des Lebens stark ausgeprägt.

Die Wachstumsrate der Linse nimmt mit dem Alter des Individuums ab. Im komplexen Stoffwechsel finden wir daher bei jungen Linsen eine gewisse Ähnlichkeit zum Stoffwechsel rasch wachsender Gewebe, der sich im Verlauf des Lebens zum Stoffwechselverhalten eines ruhenden Gewebes wandelt.

In den letzten Jahren haben die Beobachtungen zugenommen, wonach die Verbindung verschiedener Medikamente mit Nebenwirkungen einhergehen kann, die die Linse des Auges betreffen. Es sollte daher untersucht werden, ob die Zytostatica, Trenimon und Endoxan, bei in vitro Anwendung einen Effekt auf den Energiestoffwechsel von Linsen zeigen, wobei diese Untersuchungen an zwei Alterskollektiven durchgeführt werden sollten, um sowohl die Stoffwechselsituation der wachsenden Linse als auch die einer nur noch gering

wachsenden Linse zu erfassen. Als Kriterium der Stoffwechselkontrolle werten wir die Bestimmung des Gehaltes an den energiereichen Phosphaten des ATP, ADP und AMP sowie des wasserstoffübertragenden Co-Enzyms, NAD.

2. Entwicklungsgeschichtliche Übersicht

Die Linse ist ein rein ektodermales Organ, das durch Abschnürung aus dem Ektoderm gegenüber dem Augenbecher entsteht.

Die ersten sichtbaren Augenanlagen sind zwei Sehgruben am vorderen Teil der noch offenen Neuralrinne beim 2,5 mm langen Embryo. Nach Vollendung des Hirnrohres stülpen sich die primären Augenbläschen aus der Wand des Prosencephalons ektodermwärts vor. Jede dieser Augenanlagen gliedert sich dann in die dickere Augenblase und den dünneren Augenblasenstiel. Es verdickt sich dann die dem Ektoderm angelagerte Augenblasenkuppe und stülpt sich infolge ungleicher Wachstumsvorgänge in den Hohlraum der Augenblase hinein. Es entsteht dadurch der doppelwandige Augenbecher mit einer dünneren äußeren und dickeren inneren Epithelwand.

Die Entwicklung der Linse läuft mit der Entwicklung des Augenbechers parallel. An der Berührungsstelle mit der Augenblase verdickt sich das Ektoderm zur Linsenplatte. Bei der Einstülpung der Augenblase sinkt die Linsenplatte ein und bildet das Linsenrübchen, welches durch weitere Einbuchtung zum Linsensäckchen erweitert. Das Linsensäckchen schnürt sich schließlich als Linsenbläschen völlig vom Ektoderm ab, und es schiebt sich eine Mesodermschicht davor als Anlage der Hornhaut und des Vorderblattes der Regenbogenhaut.

Der Epithelzellenbelag der vorderen Wandung des Linsenbläschens bleibt aus fast kubischen Zellen zusammengesetzt, während die Zellen der hinteren Wandung sich zu Fasern strecken und als

Wulst in das Bläscheninnere vorwachsen, bis sie schließlich das ganze Lumen des Linsenbläschens ausfüllen.

Wo die Vorderfläche der Kugel in die Hinterfläche übergeht, am Äquator, ist auch der allmähliche Übergang der Epithelzellen in die Fasern.

Die Zellen sezernieren um das ganze Gebilde dann die Linsenkapsel, die somit, wie auch die restliche Linse, rein ektodermaler Herkunft ist.

Um die zuerst gebildeten Linsenfasern legen sich schalenartig immer wieder junge Faserschichten herum, die gebildet werden durch Auswachsen neuer Epithelzellen am Äquator.

Zum besseren Verständnis des ganzen Vorganges ordneten DEJEAN und Mitarbeiter folgende ineinander übergehende Stadien zu:

1. Das ektodermale Stadium
2. Das vesikuläre Stadium
3. Das Stadium der embryonalen Kernbildung
4. Das Stadium der foetalen Kernbildung.

3. Anatomie und Physiologie der Linse

Während der Foetalzeit wird die intensiv wachsende Linse, die selbst gefäßfrei ist, von einem ausgedehnten, gefäßreichen Mesenchym allseits umzogen. Diese tunica vasculosa lentis besteht vorne aus der Pupillarmembran mit Gefäßen aus dem Ciliarsystem, hinten aus Verzweigungen der art.hyaloidea, die als Fortsetzung der art.centralis retinae den embryonalen Glaskörper axial durchzieht.

Diese Gefäße bilden sich gegen Ende der Schwangerschaft zurück, so daß bei der Geburt die Linse vom Kammerwasser allein ernährt wird. Gelegentlich können sowohl vor wie hinter der Linse Reste

dieses gefäßführenden Mesenchyms zurückbleiben und sogar zu ausgedehnten Linsentrübungen Anlaß geben.

Der Krümmungsradius der hinteren Linsenfläche beträgt recht konstant 6 mm, während die Wölbung der Vorderfläche je nach Accommodationszustand und Alter des Individuums eine Radiuslänge zwischen 6 und 10 mm hat. Die umhüllende Linsenkapsel zeigt an ihrer Circumferenz typische Dickenunterschiede, ganz im Gegensatz zu anderen Grenzmembranen.

Die Linse ist an den Zonulafasern befestigt. Im Zentrum der Linse bildet sich ein festerer Kern, der im Laufe des Lebens an Größe und Härte zunimmt. Während sich in der Linsenrinde deutlich strukturierte Linsenfasern in Form platt-rechteckiger, feiner Bänder finden, die in regelmäßiger Begrenzung miteinander verzahnt sind, ist der Linsenkern weitgehend homogen und strukturlos. Die älteren Linsenfasern werden hier unter Wasserverlust und Änderung der Linseneiweißsubstanzen mumifiziert. Der Zelldetritus kann nicht nach außen abgegeben werden. Der Eindickungsprozeß verhindert eine zu starke Größenzunahme der Linse im Alter; immerhin verdoppeln sich ihr Gewicht und Volumen im Laufe des Lebens.

Der Wassergehalt der Rinde liegt bei etwa 70 % und der des Kerns bei 50 %. Das spezifische Gewicht nimmt von 1,034 der 20jährigen auf etwa 1,070 der 50jährigen Linse zu. Der Brechungsindex ist in den einzelnen Linsenzonen verschieden; durchschnittlich beträgt er etwa 1,43.

Eine Untersuchung der Linse mit fokaler Beleuchtung zeigt, daß dieses optische Organ nur relativ durchsichtig ist und bei intensiver Beleuchtung deutliche Lichtreflexion erkennen läßt. Die Spaltlampe erlaubt außerdem, im Innern der Linse scharf umgrenzte, schmale Zonen festzustellen, in deren Bereich sich die optische Dichte sprunghaft ändert. Es sind Discontinuitätszonen, deren Entstehung offenbar mit einem vorübergehenden Wachstumsstillstand in bestimmten Lebensphasen zusammenhängt. Diese Zonen gestatten dem Ophthalmologen genauere Lokalisation von Trübungen und oft auch die Festlegung des Alters einer solchen pa-

thologischen Veränderung.

Vorne grenzt die Linse zentral an die Pupillaröffnung der Iris, bildet also einen Teil der hinteren Wand der Vorderkammer. Seitlich kommt sie nahe an den orbiculus ciliaris und wird dort vom Kammerwasser der hinteren Kammer umspült. Hier treten die zum großen Teil sich kreuzenden Zonulafasern an sie heran. Hinten ruht die Linse auf dem Glaskörper, von der Glaskörpergrenzmembran zentral durch einen kleinen, retrolentalen, von Kammerwasser erfüllten Raum getrennt, wo das Linsenfasergewebe nur durch eine dünne Kapsel geschützt ist. Die Linse ist frei von Blutgefäßen und Nerven. Eigentliche Entzündungen und Zirkulationsstörungen fehlen deshalb.

Die Linse ist anatomisch isoliert und hat nur humorale Verbindungen mit ihrer Umwelt. Das Kammerwasser umspült sie, und ihre Ernährung und der Abtransport ihrer Stoffwechselprodukte erfolgen durch das Kammerwasser und den Glaskörper, der hinter der Linse liegt.

Die Linse reagiert bei geringen Störungen in der Zusammensetzung des Kammerwassers oftmals mit einer Trübung, die zu einem Erlöschen des Sehvermögens bei sonst völlig erhaltener Augenfunktion führen kann.

Die Absonderung der intraokularen Flüssigkeit (als Kammerwasser und in den Glaskörper) geschieht vorwiegend durch die Fortsätze des Ziliarkörpers und seine pars plana. Der Abfluß erfolgt zwischen Linse und Pupillarrand hindurch in die vordere Augenkammer, dann vom Kammerwinkel durch die Fontanaschen Räume des Ligamentum pectinatum in den Schlemmschen Kanal und über deren Abfuhr ins Blut zurück.

Zahlreiche Bestandteile, wie z.B. Eiweiß, sind im Kammerwasser in geringerer Konzentration als im Blut enthalten. Die Blutkammerwasserschranke ist beachtenswert, weil viele Medikamente, die per os, intramuskulär oder intravenös verabreicht werden, normalerweise nur begrenzt ins Augeninnere gelangen.

Entzündungsvorgänge vergrößern die Durchlässigkeit der Blutkammerwasserschranke, während Suprarenin sie weitgehend sperren kann.

Mißverhältnis zwischen Zustrom und Abfluß der intraokulären Flüssigkeit führt zu Erhöhung oder Verminderung des intraokulären Druckes (Tension).

Normalerweise beträgt die Tension 18 - 20 mm Hg, ist also stets niedriger als der Blutdruck. Eine Absonderung auch vom Ziliarkörper ins Auge wird dadurch begünstigt, daß eine Druckdifferenz zwischen den Kapillaren der Uvea (50 mm Hg) und dem Augennern (18 - 20 mm Hg) besteht.

Die äußere Kapsel (Linsenkapsel), die die Linse - als epitheliales Gebilde - von allen Seiten umgibt, ist ein elastisches, nicht zelluläres Abscheidungsprodukt des Linsenepithels. Sie entspricht der Basalmembran epithelialer Gebilde.

Mit dem Elektronenmikroskop hat BAHR festgestellt, daß die Linsenkapsel keine strukturlose, homogene Membran ist, wie man vorher angenommen hatte, sondern daß sie eine sehr regelmäßige lamellierte crystalline Struktur hat mit interlamellären Einlagerungen amorphen Materials.

1959 konnte JAKUS die große Ähnlichkeit und Analogie der Kapselstruktur mit der der Descemetischen Membran der Cornea feststellen.

Mit histologischen Färbemethoden konnte WISLOCKI zwei Schichten der Kapsel darstellen.

Die Kapsel ist in vivo eine semipermeable Membran und besitzt ein Membranpotential, indem mehr K^+ (Kaliumionen) innerhalb und mehr Na^+ (Natriumionen) außerhalb der Linse ist (ca. 30.2 mV (SPERELAKIS u. POTT)).

Dieses Konzentrationsgefälle wird durch den Energiestoffwechsel der Linse aufrechterhalten. Die Aufrechterhaltung dieser Konzentrationsunterschiede ist auch von Bedeutung für den Wasserhaushalt der Linse.

Außerdem findet man im Innern der Linse andere Substratkonzentrationen als im umgebenden Kammerwasser. So ist z.B. auch der Gehalt an verschiedenen freien Aminosäuren in der Linse höher als im Kammerwasser.

Die nötige Stoffzufuhr, wie bereits erwähnt, erhält die Linse aus dem Kammerwasser, und zum geringen Teil auch aus dem Glaskörper (Corpus vitreum).

Mit diesen Medien tauscht die Linse Stoffwechselschlacken gegen die für ihre Erhaltung, ihr Wachstum und ihre Funktion benötigten Nährstoffe aus.

Im Kammerwasser, dem wichtigsten Austauschmedium, hat man die für den Linsenstoffwechsel benötigten anorganischen Ionen, Kohlenhydrate (Hexosen), Sauerstoff, Aminosäuren nachweisen können. Das ernährende Kammerwasser ist von besonderer Beschaffenheit. Es kann eigentliche Giftstoffe enthalten, die den Linsenstoffwechsel in irgendeiner Phase blockieren, wie Naphthalin, Thallium oder Dinitrophenol. Es kann auch bestimmte Nährsubstanzen in zu geringer Menge enthalten, z.B. Glukose, O_2 oder Ascorbinsäure, sei es, daß die Permeabilität der Blutkammerwasserschranke gestört oder daß der Kammerwasserumsatz verändert ist.

Toxische Stoffe, die bei Erkrankung des Auges ins Kammerwasser gelangen, können schädigenden Einfluß haben; so erklärt sich wohl die Katarakta complicata bei Uveitis chronica, Retinitis pigmentosa oder Ablatio retinae.

Die Linse ist das eiweißreichste Organ des menschlichen Körpers. Mit Hilfe einer Reihe von Fermenten baut sie Proteine aus freien Aminosäuren auf, die ihr durch das Kammerwasser zugeführt werden. Diese Proteine sind organspezifisch für die Linse.

Man konnte drei wasserlösliche Proteine (α -, β - und γ -Crystallin) und ein wasserunlösliches Protein (das Albuminoid) unterscheiden.

Früher hatte man angenommen, daß Crystallin ein homogener Eiweißkörper sei. Heute ist man sich darüber einig, daß die α -Crystalline kein homogenes Eiweiß sind (BLOEMENDAL et al.).

BJÖRK konnte mittels der Methode der Chromatographie die Teilfraktionen α - und α' -Crystallin darstellen.

In dem α -Crystallin haben KINOSHITA und MEROLA im Jahre 1958 Spuren von Cystein nachgewiesen.

Nach BLOEMENDAL und TEN CATE sind die N-ständigen Gruppen von α -Crystallin G l u t a m i n und die C-ständigen Gruppen A l a n i n .

Das β -Crystallin enthält reichlich Cystein und ist weniger elektronegatv als das α -Crystallin.

Das γ -Crystallin macht etwa 20 % aller wasserlöslichen Proteine der Linse aus (BJÖRK). Eine Unterfraktion des γ -Crystallins (die sog. Fraktion C) wurde ebenfalls von BJÖRK abgetrennt. LERMAN et al. haben dieses Protein inzwischen sehr genau in seiner Zusammensetzung untersucht.

Das Albuminoid nimmt mit dem Kernwachstum im Alter zu. KRAUSE konnte feststellen, daß die embryonale Linse fast ausschließlich aus γ -Crystallin besteht, während die ältere Linse reich an Albuminoid ist.

Die eiweißabbauenden Fermente, Proteasen, die in der Linse vorhanden sind, wirken erst bei einem pH, das saurer ist als pH = 7,4 (normale Linse). Jede "Säuerung" kann deshalb zu Eiweißzerfall und Trübung führen.

Die Linsenrinde ist wahrscheinlich die Stätte der Proteinsynthese in der Linse, da sich hier die Mikrosomen mit den Fermenten in der Hauptsache befinden.

Außer den Eiweißkörpern befinden sich in der Linse Neutralfette, Fettsäuren, Lipide, Phosphatide, Cerebroside und Sterine (KRAUSE, FELDMAN).

BÜRGER hat in den Linsen von jungen Pferden den Lipid- und Cholesteringehalt untersucht, und die Gesamt-Lipide betrugen 3,16 % bei einem Ausgangswert von 500 g Trockensubstanz. Diese Gesamt-Lipide enthielten 8,4 % Cholesterin und 0,63 % Phospholipide.

Der Gehalt an Lipoiden in der Rinderlinse ist gering.

DARK hat ebenfalls in Rinderlinsen Cholesterin und die Phospholipide (Lecithin und Sphingomyelin) gefunden.

Außer Lipoprotein, Cholesterin, Lecithin und Sphingomyelin konnten PIRIE und VAN HEYNINGEN auch die nicht-nukleotiden Phosphate (Glycero-phosphoryl-cholin, Glycero-phosphoäthanolamin, Phosphoryl-cholin und Phosphoryl-äthanolamin) in der Linse nachweisen.

Nach KIRSTEN und MURADOW wird das Cholesterin in der Linse selbst synthetisiert. Man glaubt, daß der Cholesteringehalt der Linse im Alter zunimmt.

Nach FELDMAN müssen die früher gefundenen Werte durch moderne Untersuchungsmethoden korrigiert werden.

Mucopolysaccharide sind von BÜRGER aus Linsen isoliert.

Außerdem ließen sich papierchromatographisch Galaktose und Aminosucker (Hexosamin) nachweisen.

Der Wassergehalt der Linse im Vergleich mit anderen Geweben ist niedrig. Nach Untersuchungen von HOCKWIN beträgt der Wassergehalt von Rinderlinsen durchschnittlich etwa 70 %. Der Wassergehalt nimmt beim Altern der Linse ab. Die Aufrechterhaltung des Wassergleichgewichtes soll eng verknüpft sein mit dem Na^+ - und K^+ -Austausch der Linse.

4. Der Kohlenhydratstoffwechsel der Linse

Die zahlreichen Untersuchungen der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, daß die Linse einen eigenen Stoffwechsel besitzt, der sie befähigt, Stoffe aus dem Kammerwasser aufzunehmen und damit Substanzen (sogar organspezifisch) aufzubauen. Durch diese Stoffwechselprozesse wird Energie geliefert, um das bis ins hohe Alter

andauernde appositionelle Faserwachstum zu ermöglichen, den physikalisch-chemischen Zustand der Durchsichtigkeit aufrechtzuerhalten und den Akkommodationsakt zu vollziehen, an dem wahrscheinlich die Linsensubstanz auch aktiv beteiligt ist.

Die Linse benötigt Energie auch für die Resorption gewisser Stoffe aus den umgebenden Nährmedien. REDDY und KINSEY konnten zum Beispiel für zahlreiche Aminosäuren nachweisen, daß diese mit Hilfe eines energiefordernden Prozesses aus dem Kammerwasser in die Linse durch aktiven Transport übertreten.

Man spricht von einzelnen Stoffwechselarten wie Eiweiß-, Kohlenhydrat-, Fett- oder Mineralstoffwechsel und versucht ihre Mechanismen einzeln darzustellen. In Wirklichkeit sind diese einzelnen Stoffwechselarten aber miteinander verbunden und verwoben.

Die Mechanismen mancher Stoffwechselprozesse der Linse sind lückenhaft bekannt, aber die Anwesenheit zahlreicher Fermente und Redoxsysteme gibt schon einen Hinweis auf ein ebenso kompliziertes Stoffwechselgeschehen wie bei anderen Geweben.

Vor allem durch die Untersuchungen von MÜLLER wurde gezeigt, daß der Stoffwechsel der Linse beim Altern des Individuums Veränderungen erleidet.

Die Untersuchungen von KINSEY, KLEIFELD u. HOCKWIN, KIRSTEN u. DARDENNE, GLASMACHER, CREMER-BARTELS sowie LIESENHOFF konnten zeigen, daß Umweltbedingungen den Linsenstoffwechsel zu beeinflussen vermögen. Gleichzeitig wurde aber auch gefunden, daß der Linsenstoffwechsel eine gewisse Anpassungsfähigkeit an Veränderungen der Umwelt besitzt.

HOGEBOM, DIXON und WEBB konnten durch Differentialzentrifugierung des Linsenmaterials vier Fraktionen trennen; sie erhielten:

- a) die Zellkerne (als schwerste Partikel)
- b) die Mitochondrien
- c) die Mikrosomen und
- d) den Überstand.

In der Linse, wie auch in anderen Zellen des Körpers, befinden sich die glykolytischen Enzyme im cytoplasmatischen Raum, während die Enzyme der oxydativen Phosphorylierung strukturell an die Mitochondrien gebunden sind.

Die Enzyme der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Zyklus fanden sich hauptsächlich in dem Überstand.

Die Mikrosomen dürften für den Großteil der Proteinsynthese der Zellen mitverantwortlich sein.

In den Zellkernen hat man weniger Enzyme gefunden. Der größte Teil der Stoffwechselprozesse der Linse läuft, wie auch in anderen Zellen, im Überstand (d.h. im Cytoplasma) ab.

Die Bausteine des Eiweißstoffwechsels der Linse sind die Aminosäuren aus dem Kammerwasser. Der genaue Ablauf der Eiweißsynthese ist noch nicht geklärt. Nach CAMPBELL soll die Aminosäure, als erste Stufe zur Eiweißsynthese, aktiviert werden mittels ATP und aktivierender Enzyme. Durch Polymerisation über die Ribosenukleinsäure (RNS), die als Matrix an den Chromosomen zur Proteinsynthese dient, werden die so aktivierten Aminosäuren sich vereinigen. In bezug auf Eiweißabbau hat schon seit 1934 KRAUSE die Autolyse der Eiweiße in der Linse beschrieben.

Endopeptidasen wurden in der Linse bereits nachgewiesen, die nach DEVI eine Ähnlichkeit mit dem Kathepsin aufweisen.

Außerdem sind gewisse Exopeptidasen in der Linse nachgewiesen worden, die nach KINOSHITA und MANSURAT γ -Glutamyl-Verbindungen in Glutathion spalten. Nach CLIFFE und WALEY sind diese Exopeptidasen in den Zellkernen der Linse lokalisiert. Jedoch ließ sich γ -Glutamyl-Laktamase, die das γ -Glutamin-Glycin in Pyrrolidin-Carbonsäure und Glycin spaltet, im Überstand auch nachweisen.

In der Nährflüssigkeit der Linse sind im Gegensatz zu den anderen Zellen keine größeren Eiweißkörperbruchstücke angeboten. Es gibt jedoch bestimmte Aminosäuren, die unbedingt zum weiteren Wachstum der Linse erforderlich sind. Linsentrübungen sollen

dann entstehen, wenn der Körper nicht selbst diese essentiellen Aminosäuren bilden kann oder diese notwendige Aminosäure nicht mit der Nahrung zugeführt wird.

Beispiele von solchen essentiellen Substanzen sind Tryptophan, Histidin und Threonin.

Die aus dem Kammerwasser in die Linse eingebrachten Aminosäuren können durch Abbau und Umbau in andere Aminosäure verwandelt werden. Die Linse ist auch fähig, neue Aminosäuren aus Abbauprodukten des Kohlenhydratstoffwechsel durch Anlagerung von Ammoniak aufzubauen.

In der Linse können Peptide, Polypeptide und Eiweiß aus den Aminosäuren entstehen. Das Glutathion ist ein wichtiges Peptid, das als Wasserstoffüberträger und Kof ferment in der Redoxreaktion eine große Rolle spielt.

In der Linse kommen als Wasserstoffakzeptoren außerdem Ascorbinsäure, verschiedene Dehydrasen und Glutathion in Frage, jedoch liegt nur etwa 3 % des Linsen-Glutathions in oxydierter Form vor.

Nach MÜLLER, HOCKWIN u. DARDENNE besitzt die Linse die Fähigkeit, wie die Leberzellen, das bei dem Abbau von Aminosäuren anfallende Ammoniak als Harnstoff zu entgiften.

Die Fermentbildung gehört zum Eiweißstoffwechsel der Linse, und es ist möglich, daß die hereditären Anlagen gerade in diesem Bereich besonders einwirken.

Andere Autoren vermuten, daß auch Umweltfaktoren die Fermentbildung beeinflussen können.

An die Desoxyribonukleinsäuren sollen die Erbeigenschaften der Linsenzellen gebunden sein (MANDEL et al.). Sie seien in den Zellkernen des Epithels und der Linsenfasern vorhanden.

Die Untersuchungen von FRANCOIS und RABAEY (wie auch von HOCKWIN et al.) können zeigen, daß nur die embryonale Linse und die Linse sehr junger Tiere befähigt sind, eine bestimmte elektrophoretisch abtrennbare Eiweißfraktion zu bilden.

Mit Hilfe von radioaktiv markierten Aminosäuren wurde es möglich, nachzuweisen, wie die Linse die Eiweißkörper, aus denen sie besteht, ständig auf- und abbauen muß. Der Kohlenhydratstoffwechsel soll nach verschiedenen Autoren der Hauptlieferant für die Energie dieses Eiweißauf- und -abbaues sein.

Der Kohlenhydratstoffwechsel liefert den größten Teil der nötigen Energie der Linse. Das Substrat des Kohlenhydratstoffwechsels ist Glukose, und sie stammt hauptsächlich aus dem Kammerwasser. Wegen der relativ geringen Sauerstoffzufuhr aus dem Kammerwasser hat man bereits früh erkannt, daß die Linse einen wesentlichen Teil ihres Energiebedarfes dadurch deckt, daß sie die zugeführte Glukose aerob zu Milchsäure (MiS) abbaut unter Bildung von energiereichem Phosphat. Daß die Linse in Gegenwart von Sauerstoff Milchsäure zu bilden vermag, ist bemerkenswert.

Drei verschiedene Wege des Glukoseabbaus sind bis jetzt bekannt. Der erste und bekannteste Weg ist die direkte Phosphorylierung der Glukose, der aus dem Kammerwasser ausgenommen ist, zum Glukose-6-Phosphat.

Als zweiter Weg wird Glukose aus eigenem aufgebauten Glykogen der Linse erst phosphoryliert zum Glukose-1-Phosphat und dann zum Glukose-6-Phosphat.

Das Glukose-6-Phosphat wird dann zum Fruktose-1,6-Phosphat und über den EMBDEN-MEYERHOF-Weg weiter abgebaut. Es ist aber möglich, daß das Glukose-6-Phosphat über den sogenannten PENTOSE-SHUNT als den zweiten Weg direkt in dem EMBDEN-MEYERHOF-Weg weiter abgebaut werden kann.

Der dritte Weg setzt Glukose über den von HERS im Jahre 1956 beschriebenen und durch VAN HEYNINGEN 1959 in der Linse gefundenen SORBITOL-Weg zum weiteren Abbau fort. Hier wird die Glukose zum Sorbitol, Fruktose, Fruktose-1-Phosphat und Fruktose-1,6-Phosphat umgewandelt und über den EMBDEN-MEYERHOF-Weg zur Brenztraubensäure weiterhin abgebaut (siehe Abb.4, S.55).

Man glaubt, daß der PENTOSE-SHUNT und der SORBITOL-Abbauweg sehr wahrscheinlich Regulationsmechanismen darstellen, die zur Ener-

gieausbeute in der Glykolyse und im Zitronensäurezyklus verwendet werden können.

Der Shunt erzeugt die Pentosen, die für die Nukleinsäuresynthese wichtig sind; er gilt außerdem als Ribose-Lieferant für die Linse. Gleichzeitig wird aktivierter Wasserstoff in Form von TPN-H (= hydriertes Triphosphopyridinnucleotid) bereitgestellt, das für viele synthetische Vorgänge von Bedeutung ist. Der Abbau über das Sorbitol soll dem Linsenstoffwechsel die Möglichkeit zur Erzeugung phosphorylierter Kohlenhydrate geben, ohne die ersten Schritte der Glykolyse durchlaufen zu müssen.

Nach Untersuchungen u.a. von SHAH 1966 hat der Pentose-Phosphat-Zyklus für eine direkte Energiegewinnung fast keine Bedeutung. Die Glykolyse wurde die Hauptquelle der Energiegewinnung für die Linse. Der Sorbitolweg ersetzt nur zum Teil die Glykolyse bei der Energiegewinnung.

Im Ablauf der Glykolyse werden zwei Moleküle ATP verbraucht und vier Moleküle ATP neu gebildet. Im Sorbitolweg werden für je zwei Moleküle ATP, die verbraucht werden, drei Moleküle ATP neu gebildet.

Als ATP-Regenerator kommt der Pentose-Phosphat-Zyklus kaum in Betracht.

In der Linse, wie in den anderen Zellen des Körpers, werden die Zwischenprodukte der Glykolyse im Zitronensäurezyklus weiter abgebaut. Früher hat man jedoch den oxydativen Prozeß des Linsenstoffwechsels als energiegewinnenden Prozeß der Linse für unwichtig gehalten. Allerdings konnten HOCKWIN u. KORTE 1966 feststellen, daß die Atmung der Linse eine wesentliche Rolle in bezug auf Energiegewinnung spielt. Die Untersuchungsergebnisse dieser Forscher haben gezeigt, daß die Oxydationsenergie bis zu 25 % der gesamten Energieausbeute des Linsenstoffwechsels betragen könnte (siehe nachfolgende Tabelle).

Lens-weight (mg)	Oxyd. energy (cal x 10 ⁻³)	Glycol. energy (cal x 10 ⁻³)	Total (cal x 10 ⁻³)	Oxyd.energy in % age of total
400	18,6	61,5	80,1	22,9
400	9,6	27,5	37,1	25,8

Tabelle 1: Energy-balance by calculation of the effective data of rabbit lenses. Mean of 22 experiments
(aus: HOCKWIN u. KORTE "Biochemistry of the Various Catabolic Pathways of the Lens", Symp. Tutzing Castle, 1966)

5. Zytostatica

Einen ungewöhnlichen Aufschwung erlebte die empirische und systematische Suche nach chemotherapeutischen Substanzen, als seit 1946 in kurzer Folge Urethan, Stickstofflost und andere mitosebeeinflussende Stoffe bekannt wurden. In dieselbe Zeit fallen die Angaben von HUGGINS und anderen, welche die günstige und eindeutige Wirkung von Keimdrüsenhormonen auf bestimmte hormonabhängige Karzinome aufzeigten.

Erste Beobachtungen aus dem Ersten Weltkrieg ließen erkennen, daß das dort angewendete *Senfgas*, das Schwefellost, einen spezifischen Effekt auf Zellen haben konnte, der sich in manchen Beobachtungen mit der Wirkungsweise von Röntgenstrahlen auf Zellen vergleichen ließ.

Es fand sich ebenfalls eine Störung in der mitotischen Teilung solcher Zellen.

Bei der näheren Untersuchung dieser Substanzgruppen, die zunächst

allgemein als *Mitosegifte* bezeichnet wurden, fanden sich einmal chemische Faktoren, die auf die Vorbereitung zur Zellteilung, also Interphase, einwirken. Zweitens solche Substanzen, die im Komplex zur Realisierung der Zellteilung eine Rolle spielen, und drittens solche, die direkt in den Mechanismus der Teilung eingreifen.

Bei der näheren Erforschung der toxischen Wirkung solcher Substanzen auf den Kern ergab sich nun für viele Substanzen, wie für das inzwischen aus dem Schwefellost zum Stickstofflost weiterentwickelte Zytostaticum, weiterhin für das Triäthylenmelanin usw., daß diese Wirkstoffe zum Typus der Interphasengifte gehören.

HEILMEYER bezeichnete diese Substanzgruppen als sogenannte *Zytostatica*.

Durch die Entwicklung wirksamerer Substanzen verlor das Urethan in der Krebsbehandlung mehr und mehr an Bedeutung, so daß es heute praktisch nur noch für Intervallremissionen beim Plasmom angewendet wird (LÜHRS).

Die aus dem Kriegsgas entwickelten Stickstofflose sind tertiäre Amine. Sie bilden wasserlösliche Hydrochloride und bewirken bei Zellen kerntoxische Schädigungen, ähnlich den zytomorphologischen Veränderungen, die durch Röntgenstrahlen hervorgerufen werden können.

Man spricht aus diesem Grunde von radio-mimetischen Effekten. Es wurde aber nachgewiesen, daß die Chloräthylgruppe nicht direkt wirkt, sondern daß so vielmehr erst das sich als Zwischenprodukt bildende Äthylenimin in einer Wechselwirkung mit lebenswichtigen Strukturen sich rasch teilender Zellen als Ursache für den Wirkungsmechanismus in Betracht kommt. HOLZER versuchte einmal, die Wirkungsweise auf eine direkte Hemmung der Triosebildung innerhalb der Glykolyse zurückzuführen. Heute kann man mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die sogenannten Brückenbindungsreaktionen (also die "Crosslinkage" nach HADDOW) eine zumindest nachweisbare physiologisch-chemische Erklärung abgeben

können: Denn die Wechselwirkungen, z.B. vom Stickstofflost, können mit den bekannten Reaktionsgruppen, wie Carboxyl-, Amino-, Sulfhydrylgruppen, organischen Phosphorestern und anderen, eingegangen werden.

Allgemein bewirkt eine Veränderung der aktiven Seitenketten einen Verlust der zytotoxischen Fähigkeiten. Aber die funktionstüchtige Äthyleniminogruppe muß, um wirksam zu sein, an einen Grundkörper gebunden sein. Das geht daraus hervor, daß Äthylenimin allein keine zytotoxische Wirkung hat. Im allgemeinen wird die zytotoxische Wirkung darauf bezogen, daß die aktiven Seitenketten im Körper lineare Polymere bilden, die sich dann, ähnlich wie das in vitro mit Zellulose, Proteinen und Nukleinsäuren beobachtet wurde, mit funktionstüchtigen Proteiden oder Nukleoproteiden der Zellen vernetzen (als bereits genannter Crosslinkage-Effekt (HADDOW)) oder der Länge nach verknüpfen, und sie so zum Teil irreversibel verändern und blockieren.

Untersuchungen von WALPOLE und HENDRY u.a. haben herausgestellt, daß nur Derivate mit mehreren Äthyleniminogruppen eine starke zytostatische oder wachstumshemmende Wirkung aufweisen. Ganz im Gegensatz hierzu finden sich bei solchen Derivaten, die nur eine Äthyleniminogruppe tragen, eine starke cancerogene und mutagene Eigenschaft bei fast fehlender zytostatischer oder wachstumshemmender Wirkung. Diese gleiche Unterschiedlichkeit findet man auch bei Derivaten der Methylomid- und Epoxadreihen.

Mit neuen Grundkörpern und unter Beibehaltung der aktiven Äthyleniminogruppen synthetisierte man zunächst das Triäthylenphosphoramid und das Thiotriäthylenphosphoramid (Thiotepa), wobei das Phosphoramid den Grundkörper ergab, ähnlich wie den Grundkörper vom Insektizid E 605. Gerade dieses Thiotepa hat eine gewisse Bedeutung in der zytostatischen Therapie des bösartigen Wachstums erlangt.

In gleicher Zeit entwickelten DOMAGK, GAUSS u. PETERSEN die Äthyleniminochinone. Hier saßen die wirksamen Äthyleniminogruppen an Chinonringen. Sie reagieren mit Nukleinsäuren, hemmen die

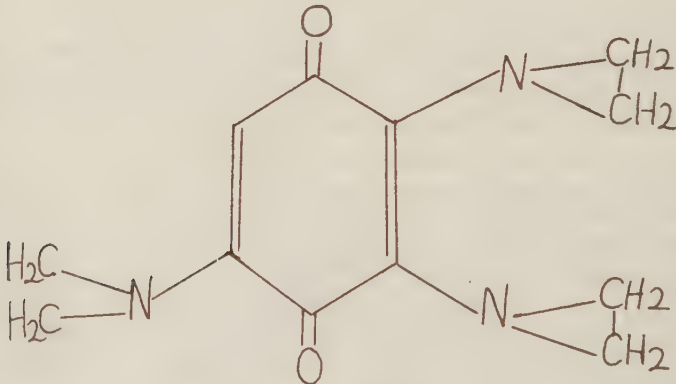
Hexoleinase und bewirken wahrscheinlich die Hemmung der Triosephosphatbildung usw.

Es konnte auch festgestellt werden, daß bis zu einem gewissen Grade Tumorzellen diesen Substanzen gegenüber empfindlicher waren als Normalzellen. Man führte dies auf das etwas stärkere saure Milieu der Geschwulstzelle zurück, aufgrund der bereits erwähnten erhöhten Milchsäurebildung.

Die Milchsäurebildung ist nun das Endprodukt der Glykolyse. Bereits 1928 sagte SELLEI, daß eine Glykolysehemmung auch eine Tumorbefruchtung bewirken könnte.

Die Äthyleniminochinone (bekannt als E 39) und die weiterhin entwickelte Variation mit drei Äthyleniminogruppen (DOMAGK) (als Trenimon in den Handel gebracht), einschließlich des Stickstoffloses usw., zeigen eine erhebliche Verminderung der Glykolyse.

Abb.2: Strukturformel von Trenimon



2,3,5-Tris-äthylenimino-benzochinon-(1,4)

Summenformel: $C_{12}H_{13}N_3O_2$

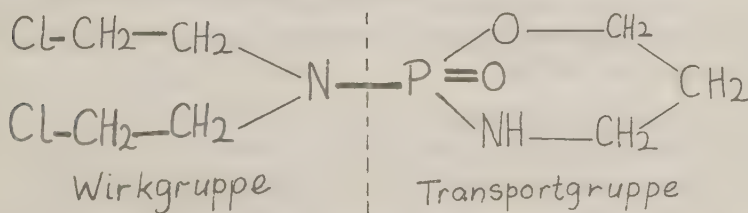
Molekulargewicht: 231,3 g

In späteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß neben der Glykosehemmung ein in der Tumorzelle nachzuweisender erhöhter N A D - Anteil spezifisch gesenkt werden kann. WILLNER konnte feststellen, daß die glykosehemmende Wirkung von Stickstofflost durch die Zugabe von Fruktose-Diphosphat absolut ausgeglichen, d.h. rückgängig gemacht werden kann. Man suchte nun nach neuen Möglichkeiten, um z.B. eine etwas selektivere Affinität bestimmter Aminosäuren zur Tumorzelle auszunutzen. So entwickelten fast gleichzeitig BERGEL in London und LARIONOW in Moskau ein Stickstofflost, das obendrein die Aminosäure Phenylalanin trug. Die Russen nannten ihr Präparat S a r k o l y s i n , wobei Phenylalanin als Razemat vorliegt, und die Engländer nannten ihr Präparat M e l p h a l a n , wobei Phenylalanin als L-Isomeres vorliegt.

In der Weiterentwicklung hat man heute Di- und Tripeptide an das Stickstofflost angehängt und versucht, so eine selektivere Wirkung zu erreichen.

Bereits 1946 wurde am Stickstoff dieser Verbindung eine zusätzliche Sauerstoffgruppe eingeführt als sogenanntes N-Oxyd-Lost. Diese besser verträgliche und gleichermaßen gut wirksame zytostatische Substanz wurde von den Asta-Werken unter dem Namen M i t o m e n (DRUCKREY) und später ein Phosphamidester dieses Stickstofflostes als E n d o x a n in den Handel gebracht.

Abb.3: Strukturformel von Endoxan (Cyclophosphamid)



N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N,O-propylen-phosphorsäure-ester-diamid

Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{PCl}_2$

Molekulargewicht: 261,102 g

Diese Substanz und das weiterentwickelte "Mitarson" tragen zusätzlich einen Phosphoramidester, wobei die Inauguratoren dieser Verbindung zunächst von dem Gedanken ausgingen, daß die mit vermehrten Phosphatasen ausgestattete Tumorzelle die zunächst unwirksame Transportform in der Geschwulstzelle dephosphoryliert, wobei dann das Stickstofflost zur eigentlichen Wirkung kommt (DRUCKREY u. RAABE; BROCK u. WILMANNS; ARNOLD u. BOURSEAUX).

Summarisch kann man sagen, daß diese neuen Verbindungen zur Zeit bekömmliche Zytostatica ohne gröbere Nebenwirkungen innerhalb therapeutischer Dosen darstellen, und daß diese Zytostatica Chemotherapeutica für viele Arten bösartigen Geschwulstwachstums darstellen.

GRAUL, HUNDESHAGEN und STEINER haben schon unter Zuhilfenahme der Technik radioaktiver Markierung selektiv sowohl die Wirk- als auch die Transportgruppe des Endoxans verfolgt und dadurch ihr metabolisches Verhalten im Organismus zum Verständnis gebracht.

Bei derselben Methode stellte man fest, daß in schnell proliferierenden Geweben, vor allem im Tumorgewebe, das Endoxan im Vergleich zum übrigen Körpergewebe in besonders hoher Konzentration vor und damit die radioaktiv markierte Wirkkomponente des Moleküls zu besonders hohen spezifischen Aktivitäten führt.

Ähnliche Untersuchungen unternahmen BOLT, RITZL u. NAHRMANN.

Das Ziel der Bestrebungen der Chemotherapie der Tumoren ist die Hemmung der Wachstumsfähigkeit der Tumorzelle mit dem Endziel ihrer Abtötung (LETTRE).

Wachstumsunfähigkeit bei sich teilenden Zellen würde man vom biochemischen Standpunkt aus als den Verlust der Fähigkeit zur Synthese von Thymonucleinsäure definieren können (LETTRE).

Angesichts der Bedeutung der energiereichen Phosphatbindungen (ATP) für das Zelleben konnte LETTRE eine tote Zelle definieren als eine Zelle, die weder ATP herstellen noch ATP verwerten kann.

Die Mehrzahl der chemotherapeutischen Agentien versucht die Zelle in einem oder mehreren Teilsystemen zu blockieren in der Annahme, daß dieses Restsystem dann nicht mehr lebensfähig oder vermehrungsfähig sei.

Nach LETTRE müssen wir beim Wachstum der Zelle also drei Phasen des Zellebens unterscheiden: die Vorbereitung der Teilung (Interphase), die Realisierung oder Auslösung der Teilung und die Teilung selbst. Für das Problem der Wachstumsbeeinflussung ergibt sich dementsprechend auch eine Dreiteilung der Hemmfaktoren, nämlich

- 1) die Stoffe, die auf die Vorbereitung der Teilung (= Interphase) einwirken (Zytostatica),
- 2) solche, die in der Auslösung der Zellteilung selbst eine Rolle spielen, und
- 3) solche, die in den Mechanismus der Teilung eingreifen (= Mitosegifte).

Vom chemischen Standpunkt aus können jedoch weitere Unterteilungen der Hemmstoffe zugrunde gelegt werden nach den Stoffklassen, mit denen der Stoff in der Zelle in Wechselwirkung tritt: Also etwa mit den Nucleinsäuren oder dem Kohlenhydratstoffwechsel oder einem speziellen Fermentsystem.

Eine weitere Einteilungsmöglichkeit ergibt sich aus der Reaktionsweise der verwendeten Hemmstoffe, indem sie

- a) eine chemische Reaktion mit Zellbestandteilen eingehen unter Ausbildung von Hauptvalenzbindungen oder
- b) indem sie in einer dissozzierenden Verbindung nur eine Komponente verdrängen (LETTRE).

Die verschiedenen Typen der Tumورهemmstoffe sind nach ihren Angriffspunkten in die folgenden Gruppen aufgeteilt:

Zytostatica: Ruhekerngifte;

Mitosegifte: Teilungsgifte;

Stoffwechselgifte: Plasmafermentgifte oder Mitochondriengifte;

Antiwirkstoffe: Antagonisten von Wirkstoffen oder Bausteinen.

6. Methodik der Versuche

a) Gewinnung des Tiermaterials

Die Linsen wurden aus den Augen von Kälbern gewonnen, die auf dem städtischen Viehhof zu Bonn geschlachtet wurden.

Geschwisterbulbi wurden in einem gemeinsamen Mullsäckchen transportiert. Während des Transports befanden sich die Augen in einem gekühlten Dewargefäß, welches dann bis zur Aufarbeitung der Augen in einer Kühlkammer bei 0° C aufbewahrt wurde.

Die Linsen wurden spätestens 3 Stunden nach dem Tode der Tiere herauspräpariert. Am Hornhautrand wurde mit einer Rasierklinge oder einer Lanzette eine Incision in die vordere Augenkammer gemacht. Etwas Kammerwasser lief ab, und die Hornhaut erschlaffte. Der Incisionsschlitz wurde nun erweitert und die Hornhaut am Limbus mit einer stumpfen Schere abgetragen.

Mit einer stumpfen Pinzette wurde die Regenbogenhaut gefaßt und an ihrer Basis abgezogen. Mit einer Pinzettenbrache wurde nun der Lederhautrand dicht neben der Linse gefaßt, in den Glaskörper gedrückt und die Linse so aus ihrem Bett luxiert. Die Linse wurde dann vorsichtig auf Fließpapier gehoben und durch Rollen auf diesem von anhaftenden Regenbogenhaut- und Glaskörper-Resten befreit. Die noch vorhandenen Zonulafasern wurden mit einer feinen gebogenen Schere entfernt.

Es wurden nur Paare von unversehrten Linsen für die Versuche verwendet.

b) Wägung

Direkt nach der Präparation der Linsen wurden sie gewogen. Die Wägung erfolgte auf einer Analysenwaage bis zu 1 mg Genauigkeit. Dazu wurden die Linsen auf ein Uhrglas von vorher festgestelltem Gewicht gelegt und das Linsengewicht durch Differenzwägung bestimmt. Die verwendeten Kälberlinsen hatten ein mittleres Gewicht von 1,1 g.

c) Inkubation

Vor der Herstellung des Linsenextraktes für die photometrischen Bestimmungen wurden die Linsen (60 Min. lang bei Endoxan-Versuchen und 180 Min. lang bei Trenimon-Versuchen) nach der manometrischen Methode von WARBURG inkubiert. Dabei wurde von Geschwisterlinsen jeweils ein Paarling mit Glucose (Endmolarität = 1×10^{-2} M), ohne Endoxan oder Trenimon und ein Paarling mit Glucose (Endmolarität = 1×10^{-2} M) plus Endoxan (Endkonzentration = 1×10^{-4} M) oder Trenimon (Endkonzentration = $7,5 \times 10^{-4}$ M) inkubiert. Je eine Linse wurde in einem Warburg-Gefäß mit Warburg-Ringerlösung bei 37° C und einer Frequenz von etwa 30 gleichmäßig geschüttelt. Dabei wurde das Volumen jeder Linse nach SCHMUTTER aufgrund des spezifischen Gewichts (= 1,1) bestimmt und die Ringerlösung bis zu einem Endvolumen von 10,0 ml unter zusätzlicher Berücksichtigung des zuzugebenden Substrats aufgefüllt.

Die Warburg-Ringerlösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

96 ml NaCl-Lösung (0,154 M)
 2 ml KCl-Lösung (0,154 M)
 2 ml CaCl_2 -Lösung (0,110 M)
 und 20 ml NaHCO_3 -Lösung (0,115 M)

In den Seitenarm des Warburg-Gefäßes wurde 0,1 ml des Substrats (Glucose) mit einer konstanten Endkonzentration von 10^{-2} Mol pipettiert. In einem Versuch wurde 0,1 ml Endoxan oder 0,1 ml Trenimon zu der Glucose in den Seitenarm gegeben. Der Kontroll-Versuch bekam weder Endoxan noch Trenimon.

d) Aufarbeitung

In einer 6 %igen HClO_4 -Lösung wurden die Linsen in gefrorenem Zustand und mit Hilfe eines Ultra-Turrex homogenisiert, sowie zweimal in einer Spinco-Kühlzentrifuge zentrifugiert, und zwar je 10 Minuten bei 19.600 g. Das Homogenat wurde in der Kälte hergestellt. Der Überstand wurde mit Filterpapier filtriert.

Das perchlorsaure Filtrat wurde neutralisiert mit 2n KOH-Lösung (Tüpfelmethode mit 2n KOH und evtl. 2n HCl). Mit Hilfe von pH-Papier wurde die Einstellung auf $\text{pH} = 7,4$ kontrolliert. Beim Überschreiten der Grenze vom sauren zum alkalischen Milieu wurden ein paar Tröpfchen einer 2n HCl-Lösung benötigt, um $\text{pH} 7,4$ wieder zu erreichen. Die Lösung wurde danach in den Kühlschrank gestellt. Nach etwa 20 Min. war die Lösung wieder abgekühlt und wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde ausfiltriert und in den Meßzylinder übertragen. Im Meßzylinder wurde der Überstand mit Aqua bidest auf 15 ml aufgefüllt. Mit dieser Lösung wurden die photometrischen Bestimmungen ausgeführt.

e) Die photometrische Bestimmung von ATP, ADP, AMP, NAD

Die Bestimmungen der ATP-, ADP-, AMP- und NAD- (oder NADH)-Konzentrationen der Linsen werden mit Hilfe enzymatischer Reaktionen ausgeführt. Diese enzymatische Analyse erfolgte im optischen Test und beruht auf der Basis der Photometrie (Lichtmessung).

Diese Methoden haben den Vorteil, daß sie aus Stoffgemischen einzelne Substanzen spezifisch erfassen und somit langwierige Trennungsoperationen überflüssig machen.

Voraussetzung für die enzymatische Bestimmung ist eine Reaktion, die mit einem spezifischen Enzym und einem Pyridinnucleotid abläuft. Die photometrische Konzentrationsbestimmung beruht darauf, daß die Schwächung eines eine Lösung durchsetzenden Lichtstrahls von der Konzentration der Lösung abhängig ist.

Die Durchlässigkeit ist das Verhältnis der Lichtintensität nach Passieren der Lösung (I) zu der Lichtintensität vor Passieren der Lösung (I_0), also $= I/I_0$. Sie nimmt mit steigender Konzentration der Lösung ab. Die Schwächung des Lichtstrahls ist also zu der Konzentration der Lösung direkt proportional.

Die Extinktion, der Grad der Auslöschung des Lichtstrahls, steht in folgender Beziehung zur Durchlässigkeit:

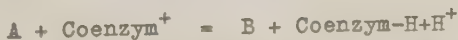
$$\text{Extinktion} = \log \frac{1}{\text{Durchlässigkeit}} = \log I_0/I$$

Zur direkten Ablesung ist deshalb auf dem Photometer die Extinktionsskala logarithmisch geteilt. Das Photometer "Eppendorf" von NETHLER & HINZ GmbH, Hamburg, wurde für diese Versuche benutzt; die ausgeführten Bestimmungen erfolgten nach der "End-Wert-Methode" bei einer bestimmten Wellenlänge. Es wird dabei ein möglichst schneller und vollständiger Umsatz des Substrates angestrebt, wodurch eine Extinktionsänderung aufgrund einer Zunahme oder Abnahme von lichtabsorbierenden Substanzen erreicht wird. Bei unvollständigem Umsatz infolge ungünstiger Gleichgewichtslage der Reaktionspartner wird ein vollständiger Umsatz durch Abfangen des Reaktionsproduktes oder durch Konzentrationserhöhung des Reaktionspartners auf der Ausgangsseite erzielt.

Es gibt zwei Möglichkeiten, um die Messung durchzuführen: eine direkte Messung oder eine Messung mit Hilfe gekoppelter Reaktionen, je nach der Art des Substrates. Die direkte Messung gilt für Substrate, die mit NAD- oder NADP-abhängigen Dehydrogenasen umgesetzt werden können.

Da bei der Umsetzung von z.B. 1 Molekül MiS oder anderem Substrat 1 Molekül NAD.H+H gebildet oder verbraucht wird, ist somit die Menge des gebildeten verbrauchten NAD.H+H ein direktes lineares Maß für die umgesetzten Stoffe.

Das NAD.H+H hat zwei Absorptionsmaxima, und zwar bei 260 nm und bei 340 nm, während das NAD nur ein Maximum bei 260 nm hat. Kommt es nun zu einer Ab- oder Zunahme des NAD.H+H, dann kann man dieses durch Änderung des Absorptionsmaximums bei 340 nm oder einer benachbarten Wellenlänge (in diesem Falle 366 nm) direkt messen.



Mit dem Photometer "Eppendorf" wurde die NAD.H+H durch die Extinktionsänderung bei 366 nm gemessen und nach folgender Formel ausgerechnet:

$$C = \frac{\Delta E \times KUV \times EV \times 100}{LFG \times SD \times \epsilon \times EM} \mu\text{Mol}/100 \text{ g LFG}$$

wobei

- C = Substratmenge (oder Konzentration) in $\mu\text{Mol}/100 \text{ g LFG}$
 ΔE = Extinktionsänderung während der Reaktion
 KUV = Küvettenvolumen
 EV = Extraktvolumen
 EM = Menge des eingesetzten Extrakts
 SD = Schichtdicke der Küvette (in cm)
 ϵ = Molarer Extinktionskoeffizient von NAD und NAD.H+H ($= 3,3 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$)
 LFG = Linsenfrischgewicht in Gramm (g)

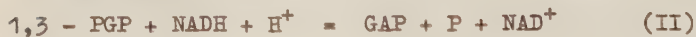
sind.

Die Bestimmungen werden im einzelnen folgendermaßen ausgeführt:

Die ATP-Konzentration wurde durch den Umsatz des ATP mit 3-Phosphoglycerat bestimmt, katalysiert durch das Enzym Phosphoglycerat.Kinase (PKG). Dabei wird ein Phosphatmolekül des ATP auf das 3-PG übertragen, es entsteht also ein 1,3-PGP und ADP.



Als Indikatorreaktion dient die Reduktion des Diphosphats und die gleichzeitige Dephosphorylierung zu Glyceraldehyd-Phosphat durch NADH, katalysiert durch das Enzym Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH):



Die Gesamtgleichung ist:



Verwendet wurde folgender Meßansatz in Anlehnung an ADAMS:

1,00 ml neutralisierter enteweißter Extrakt (pH 7,4)

0,02 ml NADH (0,012 M)

1,50 ml Reaktionsgemisch

(endgültiges Küvettenvolumen = 2,56 ml)

Das Reaktionsgemisch bestand aus:

Tris 0,5 M (Triäthanolamin-Hydrochlorid Puffer) pH 7,6

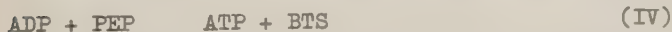
MgSO₄ 0,004 M

3-PG 0,006 M

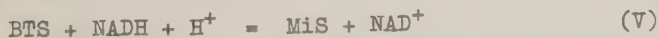
Der Meßansatz wurde nach gründlichem Umrühren zunächst ohne das Enzymgemisch in die Küvetten gebracht (Schichtdicke = 10 mm) und die Ausgangsextinktion ermittelt, wobei der Blindgang stets unter 0,001/min. lag. Dann wurde die Reaktion gestartet durch die Zugabe von 0,04 ml Enzymgemisch (4 mg GAPDH/ml, 1 mg PGK/ml). Nach der Zugabe der Enzyme wurde die Endextinktion wegen des Blindganges durch Extrapolation ermittelt. Der Endwert wurde nach durchschnittlich 20 Min. erreicht.

Die ADP- und AMP-Konzentrationen konnten in einem Meßansatz bestimmt werden in Anlehnung an ADAMS.

Zuerst wurde ADP dadurch bestimmt, daß von dem Phosphoenolpyruvat (PEP) ein Phosphat durch Katalyse von Pyruvatkinase (PK) auf das ADP übertragen wurde und dadurch ATP entstand, während das PEP zu Pyruvat dephosphoryliert wurde:



Als Indikatorreaktion diente die anschließende Umwandlung der BTS in Milchsäure (MiS) durch NADH. Sie wurde von der Lactat-Dehydrogenase (LDH) katalysiert:



Nach vollständigem Umsatz des ADP nach diesen beiden Gleichungen wurde im gleichen Meßansatz AMP bestimmt. Dazu wurde das

AMP mit Myokinase (MK) als Katalysator mit Hilfe des aus der ADP-Bestimmung gewonnenen ATP in ADP überführt.



Das so entstandene ADP lief wieder nach den oben beschriebenen Reaktionsgleichungen (IV) und (V) ab. Hierbei entsprechen jeweils 2 Mol gebildeten ADP's einem Mol AMP. Die Reaktion (VI) wird durch die Zugabe von MK gestartet. Die Hilfsreagenzien für die Gleichungen (IV) und (V) sind noch in ausreichendem Maße vorhanden, denn sie werden von Anfang an im Überschuß dazugegeben.

Der Meßansatz besteht im einzelnen aus:

1,00 ml neutralisierter, enteiweißter Extrakt (pH 7,4)
 0,15 ml FEP (0,01 M) + KCl 1,3 M und MgSO_4 0,4 M
 0,05 ml NADH (0,005 M)
 0,02 ml LDH (1 mg/ml)
 1,30 ml Trap (0,5 M, pH 7,6)

Nach Bestimmung der Ausgangsextinktion wurden die Reaktionen (IV) und (V) eingeleitet durch die Zugabe von:

0,02 ml PK (1 mg/ml)

Diese Reaktion wurde bis zum Stillstand gemessen, und dann wurde die Reaktion (VI) eingeleitet durch die Zugabe von:

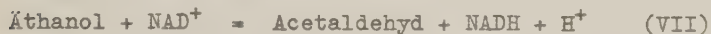
0,02 ml MK (1 mg/ml)

Auch bei diesen Bestimmungen betrug die Schichtdicke 10 mm und das Küvettenvolumen 2,54 ml bei ADP und 2,56 ml bei AMP.

Der Endextinktionswert der ADP-Bestimmung wurde nach etwa 25 Minuten und derjenige der AMP-Bestimmung nach etwa 10 Minuten erreicht.

Die NAD-Bestimmung wurde ausgeführt in Anlehnung an KLINGENBERG. Das Maß der NAD-Konzentration war die Extinktionsänderung bei der Reduktion des NAD zu NADH. Die Reduktion wurde bewirkt durch

Äthanol und durch Alkohol-Dehydrogenase katalysiert. Dabei wird der Alkohol zu Acetaldehyd oxydiert und der dabei freiwerdende Wasserstoff auf NAD übertragen:



Um möglichst das gesamte vorliegende NAD zu reduzieren, wurde eine relativ hohe Äthanol-Konzentration genommen und der gebildete Acetaldehyd durch Semicarbacid abgefangen. Äthylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA/Trilon) wurde als Fänger für die Schwermetall-Ionen (welche die ADH hemmen könnten) verwendet.

Der Ansatz bestand aus:

1,00 ml neutralisierter enteweißter Extrakt

0,05 ml EDTA (10 %ig)

0,15 ml Semicarbacid-HCl-Äthanol (1 Teil 1,0 M Semicarbacid-Lösung + 2 Teile absoluter Äthanol)

1,80 ml Trap (pH 7,6 0,5 M)

Die Anfangsextinktion und der Blindgang wurden vor der Enzymzugabe gemessen. Dann wurde 0,002 ml ADH zugegeben.

Nach dem Stillstand der Reaktion im Anschluß an die Enzymzugabe wurde die Endextinktion ermittelt. Dabei betrug das Küvettenvolumen 3,002 ml und die Schichtdicke 20 mm.

Die Endextinktion wurde nach 20 Minuten erreicht.

7. Ergebnisse

In den Tabellen 2 bis 13 sind die einzelnen Werte und die daraus errechneten für den Gehalt des ATP, ADP, AMP und NAD in Kälber- und Rinderlinsen mit und ohne Zusatz von Zytostatica eingetragen.

Da diese Versuche jeweils an Geschwisterlinsen durchgeführt worden sind, überprüften wir die Differenz der erhaltenen Mittelwerte der analysierten Substanzen durch einen statistischen Vergleich bei paarweiser Versuchsanordnung entsprechend den Angaben von HEITE. In Tabelle 14 ist ein Muster dieses Auswertungsbogens dargestellt. Unsere Ergebnisse sind nach der vorgenommenen statistischen Berechnung in Tabelle 15a von Rinderlinsen unter dem Einfluß von Endoxan, in Tabelle 15b für Kälberlinsen unter der Einwirkung von Endoxan und in Tabelle 16 von Kälberlinsen unter der Wirkung von Trenimon aufgeführt. Aus Tabelle 15a geht hervor, daß es unter der einstündigen Einwirkung von 10^{-4} molarer Konzentration zu leichten Veränderungen in der Konzentration aller Untersuchungssubstanzen kommt. Die Konzentrationen von ATP, ADP, AMP und NAD sind in den endoxanbeeinflussten Linsen geringer als in den entsprechenden Kontrolllinsen. Die hierbei gefundenen Differenzen konnten jedoch nur für die AMP und NAD statistisch gesichert werden, wie aus den Angaben für "p" entnommen werden kann. Ein ähnliches Bild wie bei den Rinderlinsen findet sich in Tabelle 15b für die Werte der unter Endoxaneinfluß stehenden Kälberlinsen. Hier lassen sich die Differenzen in der Konzentration von ATP und NAD, wie aus den Schranken für "p" hervorgeht, statistisch sichern.

Der Einfluß von Trenimon in $7,5 \times 10^{-4}$ molarer Konzentration über 3 Stunden spiegelt sich in den Werten der Tabelle 16 wider. Im Gegensatz zu der Endoxanwirkung kommt es hierbei zu einer Veränderung im Gehalt an ATP bei gleichzeitiger Zunahme im Gehalt an ADP und vielleicht auch von AMP. Die Konzentration des NAD ist gleichfalls vermindert. Wie die Schranken der "p"-Werte erkennen lassen, sind die gefundenen Differenzen im Gehalt an ATP,

ADP und NAD unter dem Einfluß von Trenimon statistisch gesichert. Aus Untersuchungen von SCHMACK und Mitarbeitern, die wir hiermit mit freundlicher Genehmigung der Autoren erwähnen dürfen, ist bekannt, daß es unter der Einwirkung sowohl von Endoxan als auch von Trenimon zu einem Absinken der Glykolyserate kommt, was entsprechend dem aktiven Stoffwechsel der jungen Linsen besonders bei den Kälberlinsen hervortritt.

8. Diskussion

Immer häufiger werden die Beobachtungen, daß Medikamente Nebenwirkungen auf die Linsen des Auges ausüben können. Es wurde daher untersucht, ob die Zytostatica (Endoxan und Trenimon) den Stoffwechsel unterschiedlich alter Linsen zu beeinflussen vermögen. Dieser Gedanke ergab sich aus der schon seit langem bekannten Tatsache, daß der Stoffwechsel einer jungen Linse in der Periode des sehr schnellen Linsenwachstums gewisse Ähnlichkeiten mit dem Stoffwechsel von Tumoren besitzt.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen kam es unter den Einwirkungen von Endoxan und Trenimon zu Veränderungen im Gehalt des ATP, ADP, AMP und NAD. Betrachtet man die von SCHMACK und Mitarbeitern beobachtete Erniedrigung der Glykolyserate im Zusammenhang mit den hier vorgelegten Ergebnissen, läßt sich die statistisch gesicherte Erniedrigung im Gehalt an ATP bei den Kälberlinsen für beide Zytostatica sinnvoll erklären. Verminderung der Glykolyse bedeutet eine Abnahme in der Bereitstellung von Stoffwechselenergie.

Die beiden untersuchten Zytostatica zeigen im Linsenstoffwechsel eine unterschiedliche Wirkung. Während unter dem Einfluß von Endoxan der Gehalt an ATP, ADP und AMP unter den der Kontroll-Linsen abgesunken ist, findet man nach Inkubation von Kälberlinsen mit $7,5 \times 10^{-4}$ molarem Trenimon bei Abnahme im Gehalt an

ATP eine Zunahme für ADP und bei nahezu unverändertem AMP.

Die Wirkung auf den Gehalt an NAD ist für beide Zytostatica gleichartig. Die beeinflussten Linsen weisen einen geringeren Gehalt an dieser Substanz auf, was besonders deutlich bei den Kälberlinsen zu erkennen ist.

Veränderungen des Linsenstoffwechsels unter Verminderung der vom Stoffwechsel bereitgestellten Energie sind sehr oft von Prozessen begleitet, die zur Entstehung von Linsentrübung führen können.

Die Ergebnisse der hier in vitro durchgeführten Untersuchungen der Zytostatica (Endoxan und Trenimon) sollten den Augenarzt deshalb darauf hinweisen, bei Patienten mit langdauernder Zytostatica-Behandlung auf das Verhalten der Linse zu achten.

9. Zusammenfassung

Die Linse besitzt insbesondere im Zeitpunkt des schnellen postnatalen Wachstums einen Stoffwechsel, der in verschiedener Hinsicht dem Stoffwechsel aerob wachsender Tumoren vergleichbar ist. An Linsen von Kälbern und Rindern wurde daher untersucht, ob der Gehalt an ATP, ADP, AMP und NAD in diesen Linsen eine Veränderung erfährt, wenn man sie in einer Nährlösung liegend unter Zusatz der Zytostatica über 1 bzw. 3 Stunden aufbewahrt.

Entsprechend der Verminderung der Glykolyserate kommt es zu einer Abnahme im Gehalt an ATP, der sich besonders bei den Kälberlinsen bemerkbar macht. Auch im Gehalt an NAD zeigten sich unter der in vitro Einwirkung der Zytostatica Veränderungen. Die hierbei festgestellte Erniedrigung im Co-Enzym-Gehalt erwies sich bei allen Versuchsreihen als statistisch signifikant. Der Effekt von Endoxan bzw. Trenimon auf den Stoffwechsel von Linsen sollte den Augenarzt darauf hinweisen, bei Patienten mit langer Zytostatica-Behandlung eine Kontrolle der Linsen durchzuführen.

10. Tabellen und Abbildung

Tabelle 2: ATP-Kälberlinsen mit und ohne Endoxan

(n)	o h n e	m i t
	(in μ Mol/100 g LFG)	(in μ Mol/100 g LFG)
1	96,48	72,39
2	197,29	138,14
3	115,25	70,11
4	117,93	87,95
5	113,44	113,68
6	184,56	127,61
Mittelwert:	137,49	101,60
=====		

Tabelle 3: ATP-Rinderlinsen mit und ohne Endoxan

(n)	o h n e	m i t
	(in μ Mol/100 g LFG)	(in μ Mol/100 g LFG)
1	104,25	32,21
2	109,47	99,55
3	80,75	77,79
4	121,80	109,33
5	95,88	94,02
6	97,67	90,38
7	128,56	128,15
8	124,92	98,73
9	70,85	107,16
10	92,33	67,89
11	139,14	101,95
12	116,39	115,89
13	112,41	120,95
14	108,76	108,69
15	105,08	113,41
Mittelwert:	107,21	97,74
=====		

Tabelle 4: ADP-Kälberlinsen mit und ohne Endoxan

(n)	o h n e	m i t
	(in μ Mol/100 g LFG)	(in μ Mol/100 g LFG)
1	57,73	45,91
2	67,13	56,51
3	54,34	62,12
Mittelwert:	59,73	54,84
=====		

Tabelle 5: ADP-Rinderlinsen mit und ohne Endoxan

(n)	o h n e	m i t
	(in μ Mol/100 g LFG)	(in μ Mol/100 g LFG)
1	76,98	66,87
2	56,95	41,74
3	49,63	41,80
4	77,13	90,62
5	49,63	40,97
6	58,09	54,89
7	43,05	44,05
8	48,52	43,79
9	29,92	41,25
10	73,63	60,66
11	47,15	48,64
12	50,84	47,01
Mittelwert:	55,13	51,86
=====		

Tabelle 6: AMP-Kälberlinsen mit und ohne Endoxan

(n)	o h n e (in μ Mol/100 g LFG)	m i t (in μ Mol/100 g LFG)
1	80,39	71,51
2	77,53	68,88
3	61,36	62,73
Mittelwert:	73,09	67,70
=====		

Tabelle 7: AMP-Rinderlinsen mit und ohne Endoxan

(n)	o h n e (in μ Mol/100 g LFG)	m i t (in μ Mol/100 g LFG)
1	77,58	74,46
2	58,58	52,44
3	41,68	39,02
4	44,46	44,32
5	51,14	51,61
6	53,62	52,86
7	60,42	60,86
8	51,85	43,56
9	41,08	42,13
10	46,90	50,95
11	59,84	57,19
12	57,24	52,89
Mittelwert:	53,69	51,86
=====		

Tabelle 8: NAD-Kälberlinsen mit und ohne Endoxan

(n)	o h n e	m i t
	(in μ Mol/100 g LFG)	(in μ Mol/100 g LFG)
1	15,16	12,17
2	16,98	14,60
3	23,19	21,67
Mittelwert:	18,44	16,15
=====		

Tabelle 9: NAD-Rinderlinsen mit und ohne Endoxan

(n)	o h n e	m i t
	(in μ Mol/100 g LFG)	(in μ Mol/100 g LFG)
1	12,72	12,27
2	12,04	9,76
3	13,88	12,86
4	9,08	8,70
5	9,05	7,88
6	11,73	9,45
7	9,62	6,42
8	8,98	9,88
9	6,19	5,80
Mittelwert:	10,69	9,22
=====		

Tabelle 10: ATP-Kälberlinsen mit und ohne Trenimon

(n)	o h n e	m i t
	(in μ Mol/100 g LFG)	(in μ Mol/100 g LFG)
1	87,35	81,25
2	96,00	84,20
3	45,50	79,20
4	86,05	79,50
5	73,30	84,98
6	58,90	51,10
7	58,00	51,20
8	61,90	38,70
9	55,20	60,90
10	78,70	73,30
11	105,60	85,50
12	81,00	66,80
13	100,10	86,30
14	103,50	73,00
15	119,70	108,10
16	89,90	92,65
17	96,95	76,65
18	82,85	60,75
19	91,80	75,65
20	72,15	66,20
21	79,80	70,05
Mittelwert:	82,10	73,61
=====		

Tabelle 11: ADF-Kälberlinsen mit und ohne Trenimon

(n)	o h n e	m i t
	(in μ Mol/100 g LFG)	(in μ Mol/100 g LFG)
1	60,30	57,00
2	50,50	49,80
3	46,00	51,90
4	56,90	53,10
5	50,20	47,70
6	55,50	54,40
7	42,60	52,20
8	49,30	51,70
9	62,50	58,60
10	58,90	55,20
11	53,70	53,10
12	51,80	57,80
13	55,50	64,40
14	35,20	57,50
15	73,60	76,60
16	38,50	59,30
17	45,10	60,20
18	42,10	55,50
19	48,30	57,20
20	51,00	49,10
21	48,10	44,20
Mittelwert:	51,21	55,54
=====	=====	=====

Tabelle 12: AMP-Kälberlinsen mit und ohne Trenimon

(n)	o h n e	m i t
	(in μ Mol/100 g LFG)	(in μ Mol/100 g LFG)
1	54,50	50,10
2	59,50	65,40
3	54,40	55,90
4	43,10	41,40
5	56,10	59,10
6	58,00	58,30
7	55,10	50,20
8	54,60	54,10
9	44,70	50,40
10	41,90	43,50
11	43,70	49,30
12	46,80	57,80
13	52,70	47,20
14	35,90	39,80
15	41,90	43,10
16	53,30	55,10
17	40,90	44,90
18	35,70	36,90
19	37,70	37,20
Mittelwert:	47,92	49,45
=====		

Tabelle 13: NAD-Kälberlinsen mit und ohne Trenimon

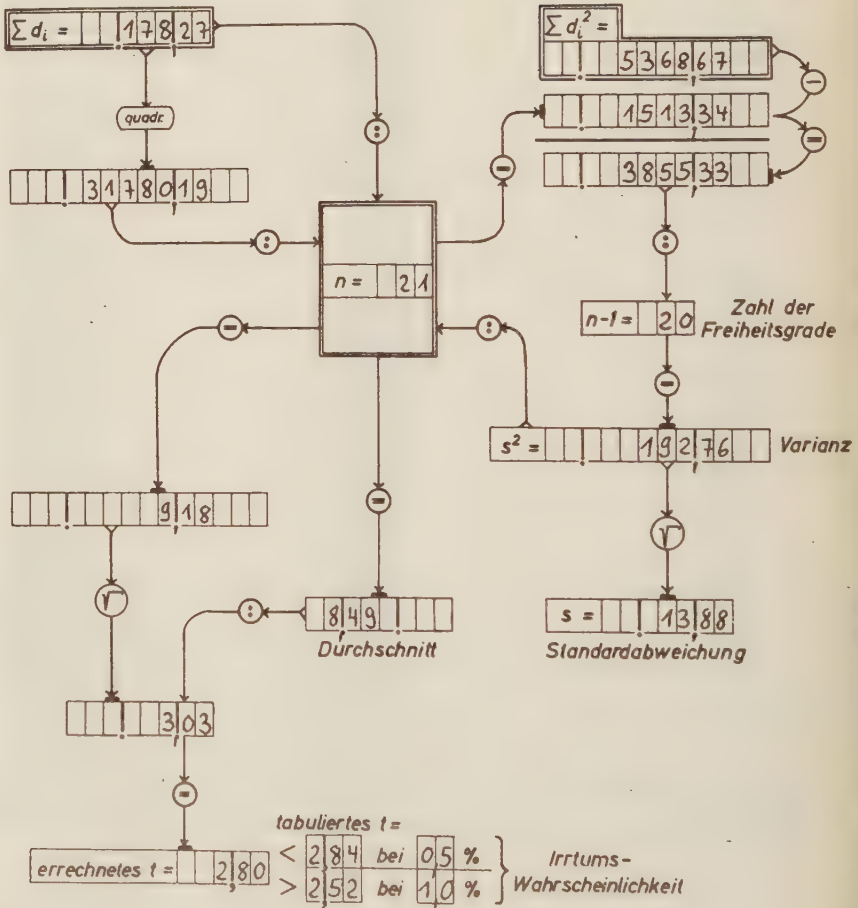
(n)	o h n e	m i t
	(in μ Mol/100 g LFG)	(in μ Mol/100 g LFG)
1	25,81	18,95
2	29,30	20,10
3	28,68	21,69
4	20,47	22,99
5	21,10	22,80
6	19,50	15,84
7	18,49	23,19
8	17,60	11,21
9	13,59	15,26
10	17,57	18,22
11	27,55	22,55
12	22,06	17,92
13	18,21	13,14
14	25,54	21,70
15	26,19	16,17
16	16,61	19,47
17	21,62	14,53
18	16,36	14,02
19	12,99	14,00
20	19,40	16,47
21	14,95	15,57
22	12,28	14,80
23	13,94	13,62
24	17,93	11,81
Mittelwert:	19,90	17,33
=====		

Tabelle 14

Vergleich zweier Durchschnitte

(bei paarweiser Anordnung der Meßwerte)

Untersuchung: Kälberlinsen mit und ohne Trenimon Nr.: 12 Datum: _____



Schlussurteil: $\neg$ keine Entscheidung; Null-Hypothese kann nicht verworfen werden
 $\times$ die Null-Hypothese ist mit I.W. von 1,0 % zu verwerfen

Anzahl der Versuche	Rind normal (in μ Mol/100 g LFG)	Rind Endoxan (in μ Mol/100 g LFG)	Δ	p
ATP	15	107,21	97,74	- 9,47 0,05 < p < 0,1
ADP	12	55,13	51,86	- 3,27 0,1 < p < 0,15
AMP	12	53,69	51,86	- 1,83 0,025 < p < 0,05
Summe	216,03	201,46		
NAD	9	10,69	9,22	- 1,47 0,01 < p < 0,0125

Tabelle 15b

Anzahl der Versuche	Kalb normal (in μ Mol/100 g LFG)	Kalb Endoxan (in μ Mol/100 g LFG)	Δ	p
ATP	6	137,50	101,60	-35,90 0,005 < p < 0,01
ADP	3	59,73	54,84	- 4,89 (t = 0,77)
AMP	3	73,09	67,70	- 5,39 0,1 < p < 0,15
Summe	270,32	224,14		
NAD	3	18,44	16,15	- 2,29 0,0125 < p < 0,025

Tabelle 16:

	Anzahl der Versuche	Kalb normal (in μ Mol/100 g LFG)	Kalb Trenimon (in μ Mol/100 g LFG)	Δ	p
ATP	21	82,10	73,61	- 8,49	0,005 < p < 0,01
ADP	21	51,21	55,54	+ 4,33	0,0125 < p < 0,025
AMP	19	47,92	49,45	+ 1,54	0,05 < p < 0,1
Summe		181,23	178,60		
NAD	24	19,90	17,33	- 2,57	0,0025 < p < 0,005

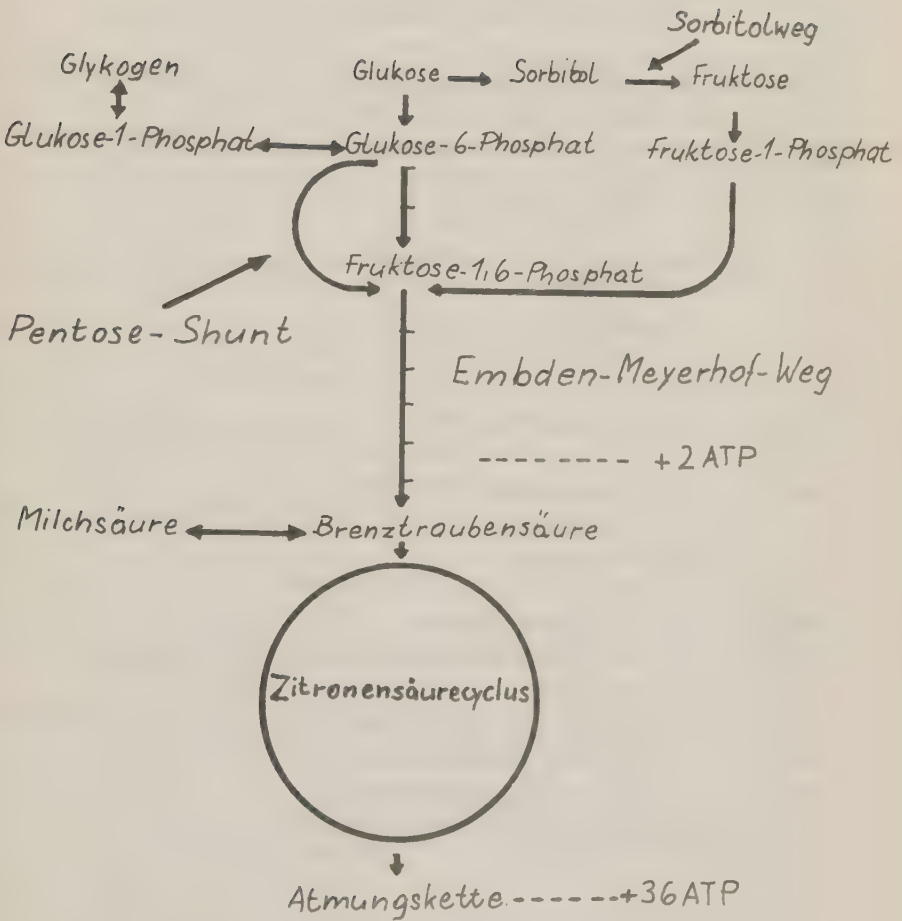


Abb.4: Schema des Kohlenhydratabbaues

(aus: MÜLLER, HOCKWIN u. DARDENNE: Almanach
f. Augenheilkunde (1964) 101-120)

11. Abkürzungsverzeichnis

ADP	=	Adenosin-diphosphat
AMP	=	Adenosin-monophosphat
ATP	=	Adenosin-triphosphat
NAD	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotid = DPN
NADH	=	Reduziertes NAD
NADP	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat = TPN
NADPH	=	Reduziertes TPN
RNS	=	Ribonucleinsäure
DNS	=	Desoxyribonucleinsäure
Gl	=	Glucose
FDP	=	Fructose-1,6-diphosphat
DAP	=	Dihydroxy-aceton-phosphat
BTS	=	Brenztraubensäure = Pyruvat
MS	=	Milchsäure = Laktat
GAP	=	α -Glycerinaldehyd-phosphat
PEP	=	Phospho-enol-pyruvat
HK	=	Hexokinase
MK	=	Myokinase
PGI	=	Phospho-Glucose-Isomerase
LDH	=	Laktat-Dehydrogenase
GAPDH	=	α -Glycerinaldehyd-phosphat-Dehydrogenase
G-6-PDH	=	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
ADH	=	Alkohol-Dehydrogenase
LFG	=	Linsen-Frisch-Gewicht
PGK	=	Phospho-glycerat-Kinase
PK	=	Pyruvat-Kinase

12. Literaturverzeichnis

- ARNOLD, H. u. F.BOURSEAUX: Synthese und Abbau zytostatisch wirksamer zyklischer N-Phosphamidester des Bis-(α -chloräthyl)-amins. Angew.Chem. 70 (1958) 539-544.
- ARNOLD, H. u. H.KLOSE: Über den hydrolytischen Abbau des hexazyklischen N-Last-Phosphamid-Esters B 518 unter physiologischen Bedingungen. Arzneimittelforsch. 11, 2a (1961) 159-163.
- BAHR, G.F.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die lamelläre Struktur der Linsenkapsel des Auges. v.Graefes Arch.Ophth. 155 (1954) 638.
- BALDWIN, E.: Dynamic Aspects of Biochemistry. Univ.Press. Cambridge (1960).
- BAUER, K.H.: Das Krebsproblem. Berlin, Springer 1949.
- BERGEL, F. u. J.A.STOCK: Brit. Empire Canc. Comp. 31 (1935) 6.
- BJÖRK, I.: Studies on α -crystalline from calf lens. Exp. Eye Res. 1 (1961) 145.
- BJÖRK, I.: Chromatographic separation of bovine α -crystalline. Exp. Eye Res. 2 (1963) 342
- BJÖRK, I.: Fractionation of α -crystalline from calf lens by gel-filtration. Exp. Eye Res. 3 (1964) 13.
- BLOEMENDAL, H., H.J.HOENDERS, J.G.G.SHOEMAKERS, A.ZWEERS und J.J.T.GERDING: Studies on α -Crystallin; On the Nature of its Subunits.
- BLOEMENDAL, H. und G.TEN GATE: Isolation and properties of crystalline from the bovine lens. Arch.Biochem. Biophys. 84 (1959) 527.
- BOLT, W., F.RITZL u. H.NAHRMANN: Untersuchungen mit einem tritiummarkierten N-Last-Derivat (Cyclophosphamid) in der Karzinombehandlung. Nuclear-Medizin Vol.2, Nr.3 (1962) 251-264.
- BOLT, W., F.RITZL u. H.NAHRMANN: Untersuchungen über Abbau, Verteilung und Ausscheidung von tritiummarkiertem Cyclophosphamid im menschlichen Organismus.
Teil I: Klin.Wschr. 16 (1962) 834-837
Verteilung und Ausscheidung des an verschiedenen Stellen im Molekül markierten Cytostaticums.

Teil II: Klin.Wschr. 40: 16 (1962) 837-842
 Umbau des Cytostaticums in vivo.

- BROCK, N.: Zur Frage der selektiven Tumorstoffwirkung von Endoxan. *Médecine et Hygiène, Genève* 17 (1959) 480.
- BROCK, N.: Krebsforschung und -bekämpfung. Bd.III. Urban und Schwarzenberg, München (1959) 347.
- BROCK, N.: Pharmakologische Grundlagen der Chemotherapie maligner Tumoren. *Oncologia* 14 (1961) 224-231.
- BROCK, N. u. H.WILMANN: Pharmakologische Grundlagen der Chemotherapie des Krebses. *Therapiewoche* 10 (1960).
- BROCK, N.: Chemotherapie des Krebses, das Problem von heute und morgen. *Die Ärztliche Fortbildung*, 12 (1962) 107-112.
- BROCK, N. und H.WILMANN: Wirkung eines zyklischen N-Lost-phosphamidesters auf experimentell erzeugte Tumoren der Ratte (chemotherapeutische Wirksamkeit und pharmakologische Eigenschaften von B 518 ASTA). *Dtsch. Med.Wschr.* 83 (1958) 453-458.
- BROCK, N.: Zur pharmakologischen Charakterisierung zyklischer N-Lost-Phosphamidester als Krebs-Chemotherapeutica. *Arzneimittelforsch. (Drug Res.)* 8 (1958) 1-9.
- BROCK, N.: Neue experimentelle Ergebnisse mit N-Lost-Phosphamidestern. *Strahlentherapie*, Bd.41, 3 (1959) 347-354.
- BÜRGER, M.: Biomorphose der Säugetierlinsen. *Klin. Monatsblätter für Augenheilkunde*, Bd.142 (1963) 22-39.
- COGAN, D.G.: Anatomy of Lens and Pathology of Cataracts. *Exper. Eye Res.* 1 (1962) 291-295.
- CORI, C.F.: *American J. Cancer*, 10 (1926) 265.
- DARDENNE, U. u. G.DRECHSLER: Die Aktivität der Milchsäuredehydrogenase in tierischen und menschlichen Augenlinsen. *Alb. v.Graefes Arch.Ophth.* 164 (1961) 156-162.
- DARK, A.J.: The Distribution of Lipids in the Bovine Lens and Cornea. *A.M.A. Arch.Ophth.* 59 (1958) 676-682.
- D'ASARO, B.S., R.G.YOUNG u. H.H.WILLIAMS: Lipids of the Lens, Cornea, Iris, Ciliary Body and Retina. *A.M.A. Arch. Ophth.* 59 (1958) 676-682.
- DE JEAN, Ch., G.LEPLAT u. Fr.HERVUET: *L'Embryologie de l'oeil et sa tératologie*. Masson & Cie. 310 (1958).

- DEVI, A.: Characterisation of the Intracellular Proteolytic Enzymes in the Lens. Amer.J.Ophth. 42, No.1, Part II (1959) 29-32.
- DISCHE, Z. u. G.EHRLICH: The Breakdown of Glucose and its Phosphoric Esters in the Bovine Lens Capsule. Amer.J. Ophth. 39, No.2, Part II (1959) 99.
- DIXON, M. u. E.C.WEBB: "Enzymes". Longmann & Green, London.
- DOMAGK, G., S.PETERSEN u. W.GAUSS: Ein Beitrag zur experimentellen Chemotherapie der Geschwülste. Z.Krebsforsch. Bd.59 (1953/54) 617-622.
- DRUCKREY, H.: Chemotherapie des Krebses (experimentelle Grundlagen). Klin.Wschr. Jg.33, Heft 47/48 (1955) 784.
- DRUCKREY, H.: Chemotherapie des Krebses. Med. Klinik 56 (1961) 1421-1430.
- DRUCKREY, H., B.T.KUK, D.SCHMÄHL u. D.STEINHOFF: Kombination von Operation und Chemotherapie beim Krebs. Münch. Med.Wschr. 100 (1958) 1913-1918.
- DRUCKREY, H. u. S.RAABE: Organspezifische Chemotherapie des Krebses (Prostata-Carcinom).
- ELY, L.A.: Metabolism of the Crystalline Lens. I. Water Content and Growth Rate. Amer.J.Ophth. 32, No.6, Part II (1949) 215-219.
- ESCHBACH, W. u. E.NEGELEIN: Über den Stoffwechsel des Endometriums. Arch.Gyn. 187 (1955) 77-82.
- EULER, H. von u. B.SKARZYNSKI: Biochemie der Tumoren. Ferd. Enke Verlag, Stuttgart (1942).
- FELDMAN, G.L.: Lipids of the Human Lens. Symp. Tutzing Castle, 1966.
- GOLDSCHMIDT, M.: Beitrag zur Physiologie und Pathologie der Kristalllinse. Alb. v.Graefes Arch.Ophth. 93 (1917) 447.
- GRAFFI, A. u. H.BIELKA: Probleme der experimentellen Krebsforschung. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1959.
- GRAFFI, A. u. E.J.SCHNEIDER: Über die Beziehungen der Mitochondrien zur anaeroben Glykolyse. Naturw. 43 (1956) 376.
- GRAUL, E.H., H.HUNDESHAGEN u. B.STEINER: Stoffwechseluntersuchungen über ^3H - und ^{14}C -markiertes Cyclophosphamid. Atompraxis 12 (1961) 449-453.

- HARRIS, J.E. u. L.GRUBER: The Electrolyte and Waterbalance of the Lens. *Exper. Eye Res.* 1 (1962) 372-384.
- HEILMEYER, L.: In: Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung. Berlin, Springer-Verlag (1954).
- HERS, H.G.: Presence of Sorbitol in seminal vesicles and foetal blood of sheep. *Biochemical Journal* 66 (1957) 30.
- HESSELVIK, L.: An Electrophoretical Investigation on the Proteins of the Eye Lens and the Vitreous Body. *Skand. Arch.Physiol.* 82 (1939) 151.
- HOCKWIN, O., H.FINK u. E.WEIGELIN: Das Verhalten verschiedener Fermentaktivitäten der Hähnchenlinse während des ersten Lebensjahres. *Zschr. für analytische Chemie*, Bd.243 (1968) 723.
- HOCKWIN, O.: Die Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs der Augenlinse durch chemische und physikalische Einwirkungen. *Z.Phys.Chem.* 173 (1959) 108.
- HOCKWIN, O.: Untersuchungen des Phosphatstoffwechsels von Linsen mit Hilfe der Ionen-Austausch-Chromatographie. *Graefes Arch.Ophth.* 162 (1960) 339.
- HOCKWIN, O. u. I.KORTE: Biochemistry of the Various Catabolic Pathways of the Lens. *Biochemistry of the Eye*, Symp. Tutzing Castle (1966) 216-225.
- HOCKWIN, O., H.KHABBAZADEH, E.NOLL u. W.LICHT: Untersuchungen des Gehaltes an freien Nucleotiden und anderen säurelöslichen Phosphatverbindungen in Linsen verschiedener Tierarten in Abhängigkeit vom Lebensalter. *Alb. v.Graefes Arch.Klin.Exp.Ophthal.* Bd.174 (1968) 245-253.
- HÖLZEL, F., H.MAASS u. W.SCHMACK: Studien zum Einfluß von Röntgenstrahlen und Trisaethylen-Imino-Benzochinon auf den Stoffwechsel von Yoshida-Aszites-Sarkomzellen. *Strahlentherapie*, Bd.119, Heft 2 (1962).
- HOGEBOM, G.H.: *Methods of Enzymology*. Vol.II, Academic Press, New York (1955) 16-18.
- HOLZER, H., G.SEDELMAYR u. A.KEMNITZ: Zum Wirkungsmechanismus carcinostatischer Chemotherapeutica. Hemmung der Glykolyse durch Äthylenimin-Verbindungen. *Biochem. Z.* 328 (1956) 163.
- HOLZER, H. u. H.KRÖGER: Zum carcinostatischen Wirkungsmechanismus von Äthylenimin-Verbindungen. *Biochem.Z.* 330 (1958) 579.

- HOLZER, H. u. A.W.HOLLDORF: Molekulare Biologie des malignen Wachstums. Springer-Verlag (1966).
- HUGGINS, C.: Endocrine substances in the treatment of cancers. J.Am.Med.Assoc. 141 (1949) 750.
- JAKUS, M.A.: The Fine Structure of Certain Ocular Tissues. Proc. IV, Electronmicroscopy Conference, Berlin (1958).
- JANY, J. u. C.SELLEI: Über die Wirkung einiger giftiger Gase auf den Stoffwechsel der Zelle. Biochem.Zschr. 275 (1935) 234-241.
- KINOSHITA, J.A.: Carbohydrate Metabolism of the Lens. A.M.A. Arch. of Ophth. 54 (1955) 360-368.
- KINOSHITA, J.A., T.C.MASURAT: Studies on the Glutathione in the Bovine Lens. A.M.A. Arch.Ophth. 57 (1957) 266-274.
- KINOSHITA, J.: Pathways of Glucose Metabolism in the Lens. Inneest.Ophth. 4 (1965) 619.
- KINOSHITA, J.A. u. L.O.MEROLA: The distribution of glutathione and proteinsulphydryl groups in calf and cattle lenses. Amer.J.Ophth. 46 (1958) 36-42.
- KIRSTEN, G. u. U.DARDENNE: Qualitative und quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Kammerwasser und Blutserum von Kälbern und Rindern. Ber.dtsch.Ophth.Ges. 64 (1961) 474-477.
- KIRSTEN, G. u. I.MURADOW: Altersbedingte Veränderungen der Cholesterinkonzentration in den einzelnen Teilen junger und erwachsener Rinderlinsen. Bericht über die 65. Zusammenkunft der Deutschen Ophth.Ges., Heidelberg (1963) 312-314.
- KRAUSE, A.C.: Chemistry of the Lens. I. Composition of Albuminoid and Alpha Crystallin. Arch.Ophth. Chicago 9 (1932) 166.
- KRAUSE, A.C.: The Biochemistry of the Eye. John Hopkins Press, Baltimore (1934).
- KUCK, J.F.R. jr.: Glucose Metabolism and Fructose Synthesis in the Diabetic Rat Lens. Investig.Ophth. (1962) 390-395.
- KUSCHINSKY, G. u. H.LÜLLMANN: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1966).

- LARIONOW, L.F., A.S.KHOKHLOV, E.N.SHKODINSKAJA, O.S.VASINA, V.J.TROOSHEIKINA u. M.A.NOVIKOVA: Studies on the Anti-Tumour Activity of p-D1 (2-chloroethyl) Amino-phenylalanine (sarcolysine). Lancet Bd.II (1955) 169.
- LERMAN, S., W.P.FORBES, S.ZIGMAN u. J.KIRMAN: A study on Gamma Crystallin Derived from the Rat and Dogfish Lens. Symp. Tutzing Castle (1966).
- LETTRE, H., H.DRUCKREY u. L.HEILMEYER: In: W.Lührs in Fragen der Krebsforschung und -behandlung. Akademie-Verlag, Berlin (1957).
- LETTRE, H.: Cytostatische Substanzen und ihre Wirkung. In: J.PIRWITZ: Grundlagen u. Praxis chemischer Tumorbehandlung. Springer-Verlag (1954).
- LEVARI, R., E.WERTHEIMER u. W.KORNBUEH: Interrelation between the Various Pathways of Glucose Metabolism in the Rat Lens. Exp. Eye Res. 3 (1964) 99-104.
- LIESENHOFF, H.: Untersuchung über einige Stoffwechselvorgänge in der Linse. Diss. Bonn (1958).
- LUHRS, W.: In: Fragen der Krebsforschung und -behandlung. Berlin, Akademie-Verlag (1957).
- MAASS, H., W.SCHMACK u. S.OPOKU: Gehalt an Glykolyse-Zwischenstoffen, Diphosphopyridinnucleotid, Adenosintriphosphat, Brenztraubensäure und anorganischem Phosphat in bestrahlten Tumorzellen nach Brenztraubensäure-Zusatz. Zschr.Krebsforsch. 65 (1963) 261-271.
- MAIZELS, L.: Factors in the Active Transport of Cations. J. Physiol. (London) 112 (1951) 59.
- MILLNER, A.N.: Canc.Chemotherap.Rep. 10 (1960) 115.
- MOESCHLIN, S.: Therapie Fibel der inneren Medizin für Klinik und Praxis. Georg Thieme Verlag (1965).
- MÜLLER, H.K., O.HOCKWIN u. U.DARDENNE: Über den Stoffwechsel der Linse. In: Almanach für Augenheilkunde. J.F.Lehmanns Verlag München (1964) 101-120.
- NADKARNI, M.V., E.J.GOLDENTHAL u. P.K.SMITH: In: Kampf dem Krebs. Oktober 1963.
- NORBY, A.: On the Growth of Crystallin Lens, the Eyeball and the Cornea in the Rat. Acta Ophth. (Kbh.), Suppl. 49 (1958).

- PIRIE, A. u. R. VAN HEYNINGEN: Acid soluble phosphates in the lens. *Biochemical Journal* 68 (1958) 18-28.
- PIRWITZ, J.: Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung (Zweites Freiburger Symposion 1953), Springer-Verlag (1954).
- REDDY, D.V.N., C.RODENBERG u. V.E.KINSEY: Steady State Distribution of Free Amino Acids in the Aqueous Humor, Vitreous Body and Plasma of the Rabbit. *Exper. Eye Res.* 1 (1961) 175-181.
- REDDY, D.V.N. u. V.E.KINSEY: Studies on the Crystalline Lens. IX. Quantitative Analysis of Free Amino Acids and Related Compounds. *Invest.Opth.* 1 (1962) 635-641.
- RINTELEN, F.: Augenheilkunde. Ein Lehrbuch für Studium und Praxis. S.Karger Verlag, Basel (1961).
- ROSS, W.C.J.: The Chemistry of cytotoxic alkylating agents, *Adv. Cancer Res.* 1 (1953) 397.
- SALLMANN, L. von, P.GRIMES u. N.McELVAIN: Aspects of Mitotic Activity in Relation to Cell Proliferation in the Lens Epithelium. *Exper. Eye Res.* 1 (1962) 449-456.
- SCHMACK, W., T.S.ONG u. I.A.SHAH: Über den Sorbitweg der Linse. *Ber.dtsch.Ophthalm.Ges.* 65 (1963) 303.
- SCHMIDT, C.G.: Über die biologische Oxydation und Glykolyse in Tumoren. *Klin.Wschr.* 33 (1955) 409.
- SCHMIDT, C.G.: Zur Frage der Erniedrigung der DPN-Konzentration in Tumoren durch Zytostatika. *Klin.Wschr.* 37 (1959) 91-92.
- SCHNEIDER, E.J., A.GRAFFI, H.BIELKA u. L.VENKER: Weitere Untersuchungen über die Beziehung zwischen Mitochondrien und Glykolyse. *Naturw.* 44 (1957) 446.
- SIPPEL, T.: Energy Metabolism in the Lens during Development of Galactose Cataract in Rats. *Invest.Opth.* 5 (1966) 576-582.
- SPERELAKIS, N. u. A.M.POTTS: Additional observations on the bio-electric potential of the lens. *Amer.J.Opth.* 46 (1959) 395-415.
- VAN HEYNINGEN, R.: Sorbitol pathway in the lens. *Exp. Eye Res.* 1 (1962) 396-404.
- WALPOLE, A.L. u. J.A.HENDRY: In: Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung. Berlin, Springer (1954).

- WARBURG, O.: Über die Ursache des Krebses. In: Molekulare Biologie des malignen Wachstums. Springer-Verlag (1966) 1-16: 17. Colloquium der Gesellschaft f. Physiologische Chemie in Mosbach/Baden (April 1966).
- WARBURG, O.: New Methods of Cell Physiology (Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden). Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1962).
- WARBURG, O.: Stoffwechsel der Tumoren. Springer-Verlag, Berlin (1926).
- WARBURG, O.: The Metabolism of Tumors. Constable & Co., London (1930).
- WARBURG, O.: Über die Entstehung der Krebszellen. Naturw. 42 (1955) 401.
- WISLOCKI, G.B.: The Anterior Segment of the eye of the Rhesus Monkey investigated by histochemical means. Amer.J. Anat. 91 (1962) 233-261.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. O. HOCKWIN für das mir entgegengebrachte Interesse und seine hilfsbereiten Ratschläge bei der Fertigstellung meiner Arbeit sowie für die Überlassung eines Labors danken.

Herrn Dr. med. W.SCHMACK möchte ich für die Anregung zu diesen Untersuchungen, seine freundliche Unterstützung und die Einführung in das Arbeitsgebiet herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. E. WEIGELIN für die Übernahme des Korreferats.

Schließlich möchte ich Herrn Rast, Technischer Assistent des Institutes, für seine außergewöhnliche Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft danken.

